annales de technologie agricole

Trtmestriel

1971

Vol. 20. N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 5-19.

CONTRIBUTION AUX ÉTUDES SUR LES VINS ROSÉS MÉRIDIONAUX

III. — Importance du mode d'élaboration sur la qualité des vins rosés (1)

P. ANDRÉ, S. AUBERT et C. PELISSE

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84 - Montfavet

RÉSUMÉ

Les techniques de vinification en rosé doivent être adaptées aux caractéristiques de chaque vendange. Différentes méthodes sont utilisables pour permettre une extraction suffisante des matières polyphénoliques du raisin afin d'assurer une constitution convenable des vins rosés sur le plan couleur et substances tanniques.

Une courte macération (saignée) est traditionnellement pratiquée dans les régions méridionales. Une voie originale, la macération carbonique du raisin, a fait l'objet d'un essai positif en vue d'obtenir des couleurs plus vives et une composition harmonieuse en matières polyphénoliques du vin.

Les appareillages modernes, comme les égouttoirs ou pressoirs pneumatiques, nécessitent une expérimentation rigoureuse en vue de préciser leurs avantages et leurs inconvénients particuliers.

L'effet de différents traitements sur les moûts (collage, débourbage) et sur les vins finis (sulfitage) sont rapportés, ainsi que la transformation naturelle d'un vin rosé par la fermentation malolactique.

L'étude de ces phénomènes vise à prévoir la constitution des moûts nécessaire pour obtenir les qualités souhaitées pour divers vins rosés.

Mots clés : *Vins rosés, vinification, qualité.*

INTRODUCTION

Dans la troisième et dernière partie de cette étude sur les vins rosés méridionaux, nous examinerons l'influence du mode d'élaboration sur la couleur et la teneur en matières polyphénoliques de ce type de vins.

Nous rappellerons tout d'abord que la vinification des vins rosés n'utilise qu'une

(1) Les première et deuxième parties de cette étude ont paru dans le n°4, 1970, des Annales de Technologie agricole.

faible fraction du potentiel « matières polyphénoliques » du raisin, et les techniq d'élaboration sont donc particulièrement délicates si l'on recherche des carac ristiques définies pour une production donnée.

Les paramètres à envisager sont nombreux et nécessitent une étude à lo terme.

Sans en attendre les conclusions, il est possible de tirer quelques enseigneme des analyses que nous avons effectuées sur des rosés authentiques.

Ces enseignements nous paraissent d'autant plus urgents qu'on assiste act lement à une évolution regrettable en matière de vins rosés méridionaux : p des raisons de commodité, on abandonne les vieilles méthodes traditionnelles saignée totale ou partielle de la cuve au profit des méthodes par pressurage di de la vendange.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Il n'existe pas de doctrine particulière précise d'élaboration des vins rosés dans les diver régions productrices (André et Aubert, 1970 ; Roson, 1967 ; Schwartz, 1968).

Les origines, les conditions de prélèvement et d'analyses des vins ont été indiquées d les deux premières parties de cette étude .

Les appareils utilisés (égouttoirs et pressoirs) sont précisés sur les tableaux de résultats.

Il nous a paru essentiel de séparer les jus successifs obtenus à l'aide de ces appareils, de laisser fermenter à part et de faire une analyse séparée de chacun des échantillons.

La vendange peut être prétraitée, avant cette extraction du jus, soit par une courte m ration classique après foulage (appelée saignée), soit par une macération carbonique du ra entier (fermentation intracellulaire en anaérobiose).

Cette macération carbonique a été effectuée dans des cuves disposant de claies en b dans le fond de façon à éviter le contact moût-vendange. La durée a été de 60 heures. Le gaz provenait d'une cuve en fermentation. Ce mode opératoire proposé est original.

L'analyse de ces techniques de prétraitement des raisins et d'extraction du jus permet a d'adapter les méthodes en fonction de la qualité de chaque récolte et des résultats à obte

Nous avons également suivi l'évolution d'un vin rosé en cuve pour étudier l'influence

— d'une conservation sur lies,
— d'une fermentation malolactique,
— d'un sulfitage avant soutirage,

sur la teneur en matières polyphénoliques.

Tous les échantillons analysés dans cette étude l'ont été après conservation en cha froide à + 5° C pendant 5 à 8 semaines.

RÉSULTATS

Ce troisième mémoire rassemble les analyses de quelques échantillons re sentatifs des techniques variées d'élaboration de vins rosés adaptées à des venda diverses de cépages méridionaux (tabl. 1).

Les tableaux 2 et 3 permettent, pour une même matière première, la com raison de techniques par macération carbonique préalable et par pressurage di

Le tableau 4 est relatif à l'influence de l'appareillage (égouttoir, type Co pressoir continu). Le troisième exemple (vendange C), placé dans le même tabl

TABLEAU I

Composition de vins rosés d'origines différentes

N° des échantillons	1	2	3	4	5	6
Cépages p. 100	*Carignan*	*Carignan*	*Grenache* 50 *Cinsaut* 50	*Grenache* 45 *Cinsaut* 30 *Ugni blanc* 25	*Grenache* 60 *Carignan* 25 *Cinsaut* 15	*Cinsaut* 35 *Grenache* 21 *Carignan* 20 *Roussane* 18 *Mourvèdre* 6
Vinifications	Macér. 5 h/CO_2	Macér. 24 h (minimum)	Macér. 8 h	Macér. 24 h	Press. direct. après foulage	Macér. 5 h/CO_2 (goutte)
Degré alcoolique (°GL)	12,1	10,7	15	11,6	12,1	11,4
Acidité totale (g/l)	4,30	4,90	4,02	4,40	4,60	4,20
Acidité volatile (g/l)	0,22	0,39	0,26	0,17	0,22	0,43
Acide malique	absence	—	absence	absence	présence	absence
pH	3,40	3,20	3,76	3,60	3,40	3,40
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,540	1,515	0,788	0,815	0,387	0,295
Teinte (DO 420/DO 520)	1,16	0,638	1,46	1,15	1,98	1,22
Longueur d'onde dominante (nm)	592	613	588	593	579,5	587,5
Facteur pureté (p. 100)	16,5	40	25	23	15,2	9,7
Luminance (Y p. 100)	70,85	33,35	62	58,2	81,0	83,45
Indice de Folin-Denis (mg acide gallique/litre)	325	288	437	455	374	272
Tannoïdes (DO 280 nm)	1,270	1,315	1,670	1,575	1,192	0,990
Anthocyanes (mg/l)	42,7	43,2	35,3	35,8	15	11,25
Leucoanthocyanes (mg/l)	90	274	264	250	198	63
Leucoanthocyanes/anthocyanes	2,1	6,3	7,5	7,0	13,2	5,6
DO 550/DO 280 nm	22,4	21,9	14,0	15,1	8,4	7,6

révèle l'importance du débourbage d'un moût sur la constitution en polyphén de deux vins rosés correspondants après évolution avec ou sans bentonite.

Le tableau 5 permet de suivre les transformations d'un vin rosé en cuve, p fermentation malolactique, avant sa stabilisation par un léger sulfitage.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

1. — *Influence de la macération préalable de la vendange*

La saignée.

Dans la première partie de cette étude, nous avions précédemment rappo l'intérêt d'une courte macération (saignée) pour améliorer la couleur des vins ro et plus particulièrement leur teinte.

La deuxième partie, relative à l'influence du cépage, a nécessité dans l'exp mentation correspondante la confrontation de trois exemples d'extraction progress de moûts par pressurage direct de vendanges de natures différentes ; à cet eff deux types de pressoir ont été utilisés.

La confrontation rigoureuse de la technique par « courte macération » avec ce par « pressurage direct » ne peut être envisagée que dans le cadre d'une cave exp mentale dans des conditions impératives de vendange, de cuverie et d'élaborat strictement comparables.

Pour de courtes durées de macération du raisin foulé, la diffusion des polyphén est fonction de multiples facteurs difficilement contrôlables dans une cave production courante, par exemple : la température et le départ en fermentat alcoolique.

Néanmoins, sur un nombre suffisant d'échantillons de toutes origines (p cinquantaine des régions méridionales) on peut relever quelques observations gé rales (voir l'ensemble des résultats des 3 parties de cette étude).

La macération, d'une durée comprise entre 5 et 24 heures dans la pratiq améliore la couleur, plus ou moins sensiblement en fonction de la qualité de cha vendange. Le gain est particulièrement appréciable pour les pigments anthoc niques par rapport à la technique par pression directe. Par contre, l'extraction tanins leucoanthocyaniques n'est pas favorisée par la saignée ; il semblerait qu'l courte durée de séjour en cuve de la vendange (5 h) coïncide avec une teneur re tivement faible de ce constituant dans les vins rosés correspondants (tabl. 1).

L'intérêt de cette observation a été souligné dans les publications relatives essais de définition des vins rosés (André et Aubert, 1970).

Pour une même teneur en anthocyanes, les vins obtenus avec les moûts pression directe de la vendange seront relativement plus riches en tanins leuco thocyaniques que les vins provenant d'une saignée. Ce phénomène peut aussi ex quer l'inflexion de la couleur vers des teintes plus rouges (vers les pourpres) p une majorité d'échantillons obtenus par saignée.

Pratiquement, nous avons là un moyen de compenser en partie l'influence cépage, par exemple le caractère tuilé des vins de *Grenache noir*.

Sur un plan plus général, Roson (1967) a montré l'intérêt de la technique macération pour les vendanges à maturité insuffisante (régions septentrional

Les conclusions des essais réalisés par cet auteur demeurent partiellement valables pour les cépages méridionaux.

Pour les échantillons de la récolte 1969, une saignée pouvant atteindre 24 heures dans quelques cas (tabl. 1) n'entraîne pas une teneur excessive en matières tanniques ; on reste dans les limites normales de bonne acceptation sur le plan dégustation de vins rosés classiques.

Il est bien évident qu'il faut rester aussi sous la limite supérieure d'intensité colorante souhaitable pour un vin rosé traditionnel. Toutefois, l'utilisation assez fréquente de raisins peu colorants, comme le *Cinsaut*, ou de coupages faisant intervenir des raisins blancs, peuvent nécessiter une « saignée » assez prolongée pour assurer une couleur suffisante au vin.

Il semble bien que dans les régions méridionales l'intérêt de la technique par saignée ait été vu depuis longtemps. Mais l'extension de l'encépagement en raisins relativement colorants a fait régresser ce mode d'élaboration au profit d'appareillages plus commodes.

La macération carbonique.

La fermentation intracellulaire des baies entières placées en atmosphère carbonique ou au sein d'un liquide, conduit à une meilleure diffusion des polyphénols du raisin dans les moûts, dans des conditions d'anaérobiose intéressantes.

Ces phénomènes ont été exploités essentiellement pour les vins rouges de macération longue et plus particulièrement dans les régions méridionales (André, 1969 ; André et Flanzy, 1966, 1968 ; Bénard et Jouret, 1963). En effet, cette méthode convient très bien pour les vendanges chaudes et pour obtenir des vins très aromatiques.

Cette voie originale n'a vraisemblablement fait l'objet que de quelques essais isolés dans le cas de la vinification en rosé (Bénard *et al.*, 1970, communication personnelle). Une courte « macération carbonique » de baies entières peut néanmoins se faire avant pressurage de la vendange (Flanzy et Bénard, 1971).

L'expérimentation rapportée (tabl. 3 et 4) permet la confrontation directe de ce procédé avec la technique commune sans macération.

Les conditions pratiques de réalisation de ces deux essais peuvent être considérées comme voisines ; cependant, il est préférable d'examiner les deux séries d'échantillons dans leur ensemble.

Une macération carbonique de 60 heures entraîne un gain appréciable d'intensité colorante, d'anthocyanes et de tanins. Sur un plan qualitatif, la teinte des vins correspondants est plus rouge franc et moins tuilée que par la technique par pressurage direct ; de plus, les rapports pigments anthocyaniques/tanins sont en faveur des premiers constituants. Ces indices confirment l'intérêt de la macération carbonique pour obtenir des vins harmonieux sur le plan gustatif, en accord avec une remarque déjà faite pour les vins rouges (Aubert et Poux, 1969).

Les résultats positifs relevés encouragent à renouveler les essais de cette technique sur des vendanges différentes et dans des conditions d'extraction variées, après une macération carbonique plus ou moins prolongée.

TABLEAU 2

Composition des vins obtenus à différentes pressions

(Essai A)

Grenache noir 75 p. 100 / *Clairette* 25 p. 100 — Tavel	Vendange foulée avant pressurage (Vaslin)						
Pression en Kg	Goutte	1	2	3	3 + 4	5	5 + 6
Volumes correspondants en hl	16	4	7	2	2	1	2
Degré alcoolique (°GL)	12,90	12,65	12,70	12,55	12,40	12,60	11,45
Sucres (g/l)	1,30	1,40	1,10	1,10	1,20	1,60	1,60
Acidité totale (g/l)	5,65	5,45	5,30	4,40	4,15	4,35	4,30
Acidité volatile (g/l)	0,20	0,15	0,15	0,15	0,15	0,10	0,05
Acide malique	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence
pH	3,10	3,11	3,20	3,78	3,89	3,92	4,00
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,730	0,610	0,840	1,450	1,870	1,870	1,900
Teinte (DO 420/DO 520)	1,43	1,35	1,60	1,42	1,53	1,53	1,37
Longueur d'onde dominante (nm)	585	587	584	589,5	589,5	592,5	594
Facteur pureté p. 100	27	22	33	47	59	53	53,5
Luminance Y p. 100	63,4	68,7	61,75	39,75	32,9	32	30,1
Indice de Folin-Denis (en mg acide gallique/l)	320	300	285	400	450	730	700
Tannoïdes (DO 280 nm)	(0,910)	1,580	(1,100)	1,670	1,875	2,740	2,680
Anthocyanes (mg/l)	7,5	7,5	7,2	27	29,7	96	82,5
Leucoanthocyanes (mg/l)	130	152	104	240	216	400	437
Leucoanthocyanes/anthocyanes	17,3	20,2	14,4	8,9	7,3	3,2	5,3
DO 550/DO 280 nm	5,5	3,15	4,4	10,8	10,6	23,4	20,5

TABLEAU 3

Composition des vins obtenus à différentes pressions
(Essai B)

Grenache noir 75 p. 100 / *Clairette* 25 p. 100 — Tavel	Macération carbonique de la vendange pendant 60 heures, foulage et envoi direct sur pressoir horizontal (Vaslin)							
Pression en Kg	Jus/cuve	Goutte	1	2	3	4	5	6
Volumes correspondants en hl	4	15	5	5	4	4	1	1
Degré alcoolique (°GL)	12,00	12,80	12,80	12,95	12,90	12,55	12,25	11,90
Sucres (g/l)	17,6	4,00	3,00	1,60	1,20	1,20	1,40	1,50
Acidité totale (g/l)	4,10	5,05	4,60	4,50	4,40	4,05	4,05	4,10
Acidité volatile (g/l)	0,45	0,35	0,25	0,20	0,20	0,10	0,15	0,15
Acide malique	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence	présence
pH	3,78	3,30	3,47	3,59	3,80	4,00	4,02	4,04
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,900	0,800	0,930	1,140	1,900 *	3,200 *	3,550 *	3,850 *
Teinte (DO 420/DO 520)	1,81	1,42	1,27	1,33	1,35 *	1,32 *	1,29 *	1,35 *
Longueur d'onde dominante (nm)	583	587	590	590	593,5 *	601,5 *	604 *	603 *
Facteur de pureté (p. 100)	34	30	29	37	61,5 *	76,5 *	80 *	83 *
Luminance (p. 100) Y	60,35	61,4	54,4	47,5	30 *	14,4 *	10,5 *	10,3 *
Indice de Folin-Denis (mg acide gallique/l)	450	212	314	325	460	826	932	970
Tannoïdes (DO 280 nm)	1,560	(1,120)	1,500	1,550	1,810	2,680	3,700	3,800
Anthocyanes (mg/l)	15,2	17,2	22,5	25,5	56,2	105	124	109,5
Leucoanthocyanes (mg/l)	(—)	142	200	196	302	581	870	915
Leucoanthocyanes/anthocyanes	(—)	13,5	8,9	7,7	5,4	5,5	7,0	8,4
DO 550/DO 280 nm	7,4	6,2	10	11	20,7	26	22,3	19,2

* Mesures de couleur effectuées sur épaisseur 1 mm et ramenées à 10 mm de vin.

TABLEAU 4

Analyse des vins obtenus à différents stades d'extraction des moûts

Cépages	Vendange (A)			Vendange (B)			Vendange (C)	
Vinification	Égout. Coq	Press. continu		Égout. Coq	Press. continu		Appareil Pera	
	1er jus	1er jus	2e jus	1er jus	1er jus	2e jus	Non débour.	Débourbé
Degré alcoolique (°GL)	12,7	12,4	11,9	11,8	11,7	11,9	11,4	11,6
Sucres (g/l)	2,90	1,32	1,44	0,92	1,44	0,92	1,25	0,62
SO_2 total (mg/l)	95	90	115	108	164	195	43	64
Acidité totale (g/l)	5,63	5,25	3,87	4,16	4,12	3,58	5,39	5,63
Acidité volatile (g/l)	0,45	0,33	0,15	0,39	0,42	0,36	0,24	0,24
Acide malique	—	—	—	—	—	—	—	—
pH	3,10	3,20	3,55	3,20	3,25	3,50	3,10	3,05
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,615	0,760	4,500 *	0,865	1,650	7,000 *	1,005	0,555
Teinte (DO 420/DO 520)	0,834	0,890	0,970 *	0,852	0,710	0,647 *	0,860	0,778
Longueur d'onde dominante (nm)	615	607	616 *	604	618	695 *	608	611
Facteur pureté (p. 100)	14,0	17,0	86 *	22,8	38,3	95 *	23,8	13,5
Luminance Y (p. 100)	64,1	57,35	5,67 *	55,15	31,35	1,97 *	46,75	67,0
Indice de Folin-Denis (mg acide gallique/l)	224	222	1 260	300	440	1 390	410	264
Tannoïdes (DO 280 nm)	1,000	0,985	5,080	1,250	1,780	6,650	1,550	1,070
Anthocyanes (mg/l)	24	24	88	23,4	57,6	212	18,3	14,2
Leucoanthocyanes (mg/l)	116,5	83	131	100	223	1 280	166,5	87,5
Leucoanthocyanes/anthocyanes	4,85	3,5	14,9	4,3	3,9	6,05	9,1	6,2
DO 550/DO 280 nm	16,0	16,25	11,5	12,5	21,6	21,2	7,9	8,9

* Mesures de couleur effectuées sur une épaisseur de 1 mm et ramenées à 10 mm de vin.

2. — *Influence de l'appareillage sur l'extraction des matières polyphénoliques*

Le foulage n'a pas fait l'objet d'étude particulière. Les meilleurs fouloirs sont ceux qui dilacèrent peu la rafle. L'éclatement des baies et le déchirement de la pellicule sont cependant nécessaires pour l'écoulement de jus colorés. Mais cette opération peut se faire directement dans le pressoir, par exemple, à l'aide des appareils pneumatiques (voir essai B de la deuxième partie de cette étude).

L'égouttage est également une phase non indispensable de l'élaboration des vins rosés. Son intérêt est discutable pour améliorer la qualité des moûts ; mais ce stockage intermédiaire est très commode pour régulariser le traitement après foulage d'apports discontinus massifs de différentes vendanges.

Le tableau 4 révèle que l'effet d'un égouttoir sur la constitution des vins de goutte correspondants diffère selon la nature de la matière première ou suivant la durée de séjour de chaque vendange dans cette cuve.

A ces premiers moûts, on ajoute généralement ceux provenant de l'écrasement mécanique de la vendange égouttée. L'efficacité d'un pressoir continu pose le problème de l'ajout des derniers jus de pression du raisin.

L'élimination de ces moûts riches en tannoïdes, matières azotées et divers sels, sera fonction de la qualité de la vendange et des caractères recherchés ou non pour les vins rosés : par exemple, forte couleur et peu d'acidité.

Le pressurage. — Comme pour la préparation des vins blancs, la phase pressurage à une importance primordiale pour la vinification en rosé.

Les différents essais rapportés dans la deuxième et troisième partie de notre étude confrontent quelques critères permettant de juger les avantages d'un appareil pour une matière première donnée.

Ainsi, le pressoir horizontal (type Vaslin) utilisé pour des vendanges à base de *Grenache noir* (tabl. 1, 2e partie et tabl. 2 et 3, 3e partie) permet d'extraire des teneurs théoriquement croissantes en composés polyphénoliques. Toutefois, dans la pratique on observe quelques anomalies à ce postulat.

1° A la reprise du 2e cycle de pression, on note une baisse des anthocyanes et plus particulièrement des leucoanthocyanes. Ceci peut paraître contradictoire avec une intensité colorante toujours croissante. Les indices de teinte montrent que les chromophores jaunes sont responsables de cette augmentation. On peut penser à un phénomène d'oxydation des polyphénols au cours de l'écoulement des jus de pressurage ; cet effet serait plus sensible que le gain en pigments et tanins diffusant du raisin sous une faible augmentation de pression.

Ce problème de l'oxydation des moûts a été souligné dans la vinification en blanc (Martinière et Sapis, 1967). Schaeffer (1968) a montré qu'une protection par une atmosphère de gaz carbonique au cours du pressurage améliore sensiblement la qualité des vins d'Alsace. Une expérimentation semblable est en cours pour les vins rosés (Bénard *et al.*, 1970, communication personnelle) ; ces essais devraient se multiplier chez les producteurs méridionaux.

2° Le jus du dernier cycle de pressurage apportera au vin rosé plus de tanins leucoanthocyaniques que d'anthocyanes ; on observe une baisse sensible de ces derniers sur les échantillons à 6 Kg de pression.

On peut donc envisager d'éliminer ces moûts si l'on veut obtenir une plus grande finesse des vins rosés, c'est-à-dire une couleur franche sans apport considérable des substances tanniques.

3° Le pressoir à effet radial (du type Pneumabilpress), d'une conception très différente du précédent, donne des résultats identiques. Toutefois, il faut remarquer des différences de comportement pour les deux cépages utilisés dans l'essai (B) de la 2e partie. Ainsi, tous les jus de presse de la vendange de *Mourvèdre* sont utilisables, car les indices examinés apparaissent favorables à cette addition, malgré des teneurs en polyphénols très élevéese n valeurs absolues ; la composition du *Carignan* évolue davantage.

Ces observations portent sur les composés polyphénoliques, mais il est évident que l'intensité du pressurage et son mode d'action ont une importance très grande dans la constitution minérale et biologique des moûts. On notera succinctement la diminution progressive d'acidité, suivie d'une légère remontée pour les vins correspondant au dernier cycle de pression. Il faut signaler aussi que la quasi-totalité des échantillons des divers essais de pressurage contiennent de l'acide malique. Le déclenchement des fermentations malolactiques n'est pas apparemment facilité par le facteur pression du raisin ; un dosage des substances azotées des différents moûts aurait été souhaitable.

De toute façon, la fermentation des moûts s'accompagne de transformations importantes de la constitution des substances qui restent dans l'extrait sec d'un vin. Cependant, cette phase de la vinification en rosé s'effectue dans la pratique la plus courante selon un processus naturel où l'œnologue n'intervient qu'accidentellement.

3. — *Transformations d'un vin rosé en cuve*

Collage-débourbage. — Une addition de bentonite dans les moûts a pour effet sur le vin rosé correspondant d'opérer essentiellement une sélection des substances protéiques et tannoïdes qui constituent deux éléments principaux des caractères organoleptiques. Nos analyses ont porté dans ces recherches sur les composés polyphénoliques (tabl. 4, vendange C).

On observe une intensité colorante nettement inférieure au témoin ; par contre, l'échantillon traité à la bentonite et débourbé a une teinte plus pourpre et, par suite, apparaît moins oxydé. De plus, alors que la teneur en anthocyanes diminue peu, par contre, les leucoanthocyanes sont en très grande partie éliminés dans le débourbage.

Diverses observations relevées dans la pratique confirment les remarques précédentes. Les collages à la bentonite ont un effet favorable sur les récoltes qui présentent une aptitude particulière à la casse oxydasique. Les chiffres donnés tendent à prouver que cette action se fait, en partie, sur les tanins leucoanthocyaniques qui sont des substrats particulièrement oxydables.

Un débourbage, avec ou sans l'aide d'une colle (l'aide d'un agent floculant le rend important et précoce), contribuera à améliorer l'équilibre de constitution des vins rosés. La qualité du produit est meilleure dans son ensemble, mais il faudra tenir compte dans la préparation des moûts de ce phénomène naturel. On peut estimer une perte d'intensité colorante qui atteint 45 p. 100 entre les 2 échantillons comparés, accompagné d'une teinte évoluant vers le rouge franc.

Rappelons que différents clarifiants sont utilisables au niveau du vin fait ; mais ce traitement éventuel ne devrait intéresser que des vins de type rosé de qualité inférieure (HERNANDEZ, 1969).

Fermentation malolactique. — Le tableau 5 révèle une évolution des caractéristiques d'un vin rosé au cours d'une fermentation malolactique normale survenue 2 semaines après la fin de la fermentation alcoolique et terminée pratiquement en 2 autres semaines. Si l'on se penche essentiellement sur les composés polyphénoliques, on observe :

1° une baisse de l'intensité colorante, sans coïncidence avec l'augmentation de la teinte tuilée du vin.

TABLEAU 5

Évolution d'un vin rosé dans une cuve

Vin rosé (type Tavel) à base de *Grenache* 75 % et *Clairette* 25 %, obtenu par pressurage direct sur vendange foulée	Prélèvement du 12 nov. Vendange le 29 sept.	Prélèvement du 17 nov. Début ferm. malolact.	Prélèvement du 3 déc. Avant sulfitage	Prélèvement du 3 déc. Après sulfitage
Acidité totale (g/l)	4,20	3,70	3,35	3,35
Acidité volatile (g/l)	0,15	0,20	0,20	0,20
Acidité fixe (g/l)	4,05	3,50	3,15	3,15
Acide malique	présence	présence	absence	absence
pH	3,2	3,4	3,6	3,6
Intensité colorante (DO 420 + DO 520)	0,800	0,790	0,635	0,570
Teinte (DO 420/DO 520)	1,32	1,61	1,62	1,59
Longueur onde dominante (nm)	589	585	582	589
Facteur pureté (p. 100)	26	27	21	17
Luminance Y (p. 100)	59,5	61,95	68	70,75
Indice Folin-Denis (mg acide gallique/l)	336	270	295	304
Tannoïdes (DO 280 nm)	1,280	1,270	1,235	1,215
Anthocyanes (mg/l)	20,2	19,5	16,5	15,75
Leucoanthocyanes (mg/l)	177	119	102	116,5
Leucoanthocyanes/anthocyanes	8,75	6,1	6,2	7,4
DO 550/DO 280 nm	10,55	10,25	8,9	8,65

2° une faible diminution des anthocyanes et tannoïdes totaux ; par contre, une chute importante et rapide de leucoanthocyanes. La teinte du vin rosé est nettement plus jaune ; ceci laisse penser à la formation de nouveaux chromophores jaunes par oxydation et transformation des tanins leucoanthocyaniques.

3° la disparition de l'acide malique, sous forme d'acide lactique, se traduit par une baisse d'acidité. Pour une teneur voisine d'anthocyanes, leur pouvoir colorant sera moins fort (par diminution de l'exaltation des pseudo-bases anthocyaniques (AUBERT, 1970) ; ceci vient diminuer l'intensité colorante.

Pratiquement, la fermentation malolactique entraîne une perte sensible de couleur (de l'ordre de 20 p. 100 dans notre exemple) et une augmentation de nuance jaune. Cependant, l'équilibre des constituants et la stabilité du vin sont améliorés.

Effet d'un sulfitage. — L'anhydride sulfureux peut diminuer légèrement l'intensité colorante d'un vin en décolorant les anthocyanes, mais sans les réduire quantitativement à la faible dose utilisée (2 g/hl) avant soutirage.

Toutefois, la teinte du vin sulfité est plus rouge franc ; on peut penser que les chromophores jaunes ont disparu de façon plus sensible que les chromophores rouges, les conditions d'acidité étant par ailleurs les mêmes dans les deux échantillons.

On observe effectivement une perte négligeable d'anthocyanes après sulfitage, tandis que le témoin renferme sensiblement moins de leucoanthocyanes. Ces derniers constituants se conserveront mieux après traitement, le vin avec SO_2 étant plus réducteur. Sur le plan gustatif, on peut penser que ce dernier échantillon est moins « souple, » sans considérer les inconvénients propres à cet antiseptique. Pratiquement, la différence est peu perceptible si la dose d'anhydride sulfureux reste très faible.

Cet essai montre bien les avantages et les inconvénients de ce traitement en vue de stabiliser les vins avant leur stockage en bouteille.

4. — *Autres facteurs de la qualité des vins rosés*

Pour conclure ces recherches axées sur les matières de nature phénolique, il est utile de rappeler quelques autres facteurs susceptibles de perturber ou de masquer toutes les observations précédentes.

Ainsi, les caractères gustatifs d'un vin rosé sont dissociables en plusieurs éléments qui se complètent ou s'opposent.

La fraîcheur est attribuée à un équilibre harmonieux des acides. On peut distinguer la quantité, ou acidité totale du vin, et la qualité des acides constituants mieux traduite par le pH. Ainsi, certains cépages pauvres en acide malique, comme le *Grenache*, donneront des vins peu acides, avec une maturité de vendange convenable. Par contre, le *Carignan* se caractérise par une certaine « rudesse » ou « verdeur » que l'on peut cependant améliorer par la fermentation malolactique des vins.

Pour les vins méridionaux examinés, plus de 60 p. 100 avaient fait cette fermentation secondaire avant le début de l'hiver.

Dans les meilleurs vins analysés de la récolte 1969, l'acidité totale se situe autour de 4,20 et le pH est voisin de 3,30.

Les sucres résiduaires sont de l'ordre de 1 à 2 g dans la majorité des vins rosés secs ; on en trouve cependant qui atteignent 4 à 5 g. Il n'est pas sûr que cet élément contribue fortement à la qualité gustative des vins rosés. Toutefois, des teneurs plus fortes peuvent conditionner la stabilité biologique du vin au cours du stockage.

Les teneurs souhaitables en acides et en sucres pour obtenir des vins rosés harmonieux sont difficiles à formuler (Amerine et Ough, 1967).

Les composés azotés, comme pour les vins blancs et rouges, interviennent très sensiblement sur les caractéristiques gustatives, la valeur nutritionnelle, la conservation des vins et la formation de troubles dans les bouteilles. Ce chapitre nécessiterait une étude particulière sur les vins rosés.

Les composés phénoliques interviennent par leurs caractères colorants, réducteurs et tanins ; mais aussi, ils peuvent jouer un rôle dans l'agrément olfactif des vins.

Le fruité d'un vin rosé est une expression de dégustateurs difficile à préciser sur un plan analytique. Peut-on faire une association entre les polyphénols et les essences aromatiques du raisin ? La localisation de ces deux types de substances est voisine mais distincte dans la pellicule ; une meilleure extraction des anthocyanes s'accompagne-t-elle d'un fruité plus marqué des vins correspondants ?

La vinification en rosé utilise moins de 5 p. 100 du potentiel en polyphénols du raisin ; on pourrait prévoir une exploitation meilleure des vendanges de bonne qualité. Une macération plus longue de raisins sains de cépages nobles aromatiques (*Mourvèdre, Grenache, Syrah,* etc.) est un moyen séduisant pour améliorer les moûts d'une vendange quelconque traitée par pressurage direct.

Cette remarque technique ne doit tout de même pas encourager les producteurs à modifier les conditions d'encépagement qui ont fait en grande partie la renommée des vins méridionaux. L'exemple de la production des « Côtes de Provence » (LONG, 1964 ; FAUVET, 1969) montre une évolution qui tient compte des traditions. Mais une adaptation aux techniques nouvelles et aux goûts changeants des consommateurs apparaît inévitable.

Signalons, pour terminer, que nous n'avons pu étudier dans ce mémoire les transformations en bouteille ou en cours de stockage des vins rosés conservés une longue période. Mais ce type de vin doit être consommé généralement jeune ; leur maturation, rarement favorable, ne dépasse pas quelques années. Certains cépages, comme le *Grenache,* apparaissent plus aptes que d'autres à la conservation des vins rosés (JOSLYN et LITTLE, 1967).

En conclusion, ces quelques données d'un problème complexe ne peuvent prétendre apporter de solutions générales pour préparer de bons rosés, mais elles cherchent essentiellement à guider les œnologues dans leur propre expérimentation à l'échelon de chaque cave individuelle. Des directives précises et définitives ne pourraient être proposées que par des essais suivis sur plusieurs récoltes, dans des conditions de vinification comparables par un même producteur.

Reçu pour publication en septembre 1970.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO RESEARCHES ON MERIDIONAL ROSÉ WINES
III. — IMPORTANCE OF THE METHOD OF PREPARATION IN WHAT CONCERNS THE QUALITY OF ROSÉ WINES

The rosé wine-making techniques must be adapted to the characteristics of each wine harvest. Different methods can be used to make possible an adequate extraction of the polyphenolic content of the grape so as to assure a suitable composition from the point of view of colour and tannic substances.

A short period of steeping (drained) is traditionnaly practised in the meridionale regions. An original process, carbonic steeping of the grape, has been the subject of successful research, with a view to obtaining brighter colours and a more balanced composition of polyphenolics.

Modern apparatus, like the drainer and pneumatic wine-presses, necessitate thorough experimentation in order for their particular advantages and drawbacks to be precised.

The effect of different treatments on the must (clarifying and settling) and on the finished wines (sulphitage) are reported as well as the natural transformation of rosé wines by malolactic fermentation.

Research on these phenomena aims at estimating the necessary composition of the musts in order to obtain the desirable qualities for different rosé wines.

RESUMEN

CONTRIBUCION A LOS ESTUDIOS ACERCA DE LOS VINOS CLARETTES MERIDIONALES
III. — IMPORTANCIA DEL METODO DE ELABORACION SOBRE LA CALIDAD DE LOS VINOS ROSADOS

Las técnicas de vinificación en clarete deben encontrarse adaptadas a las características de cada vendimia. Pueden ser utilizados distintos métodos para permitir una extracción suficiente de materias polifenólicas de la uva, con objeto de conseguir una composición conveniente de los vinos claretes desde el punto de vista del color y de las sustancias tánicas.

Una corta maceración (sangradura) se practica tradicionalmente en las regiones meridionales de Francia. Un método original : la maceración carbónica de la uva, ha sido objeto de un intento positivo con objeto de obtener colores más vivos y una composición armoniosa en cuanto a las materias polifenólicas del vino.

Los aparatos modernos, como por ejemplo los escurridores o prensas de lagar neumáticas, requieren una experimentación rigurosa con miras a precisar sus ventajas y sus inconvenientes particulares.

El efecto de distintos tratamientos sobre los mostos (clarificación-separación de las materias en suspensión) y sobre los vinos acabados (sulfitación), figura indicado en el artículo, así como la transformación natural de un vino clarete por la fermentación maloláctica.

Por el estudio de estos fenómenos se trata de prever la composición de los mostos necesarios para obtener las cualidades deseadas para diversos vinos claretes.

RIASSUNTO

CONTRIBUZIONE AGLI STUDI SUI VINI ROSATI MERIDIONALI
III. — IMPORTANZA DEL MODO D'ELABORAZIONE SULLA QUALITA' DEI VINI ROSATI

Le tecniche di vinificazione in rosato devono essere adattate alle caratteristiche di ogni vendemmia. Si possono adottare diversi metodi per consentire un'estrazione sufficiente delle materie polifenoliche dell'uva in modo da assicurare una costituzione conveniente dei vini rosati sul piano colore e sostanze tanniche.

Nelle regioni meridionali si pratica per tradizione una breve macerazione (spillatura).

Un procedimento originale, la macerazione carbonica dell'uva, è stato oggetto d'una prova (positiva) mirante ad ottenere dei colori più vivi e una composizione armoniosa in materie polifenoliche del vino.

Le apparecchiature moderne, quali gli sgrondatori o i torchi pneumatici, richiedono delle prove rigorose per definire i loro vantaggi e i loro inconvenienti particolari.

L'effetto dei vari trattamenti sui mosti (chiarificazione-eliminazione depositi) e sui vini finiti (solfitazione) sono riportati, come pure la trasformazione naturale d'un vino rosato dalla fermentazione malolattica.

Lo studio di questi fenomeni mira a prevedera le costituzione dei mosti necessari per ottenere le qualità desiderate per diversi vini rosati.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMERINE M. A., OUGH C. S., 1967. Sweetness preference in rosé wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **18** (3), 121-125.

ANDRÉ P., 1969. La macération carbonique et les vins de Châteauneuf du Pape. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, (3), 265-285.

ANDRÉ P., AUBERT S., PELISSE C., 1970. Contribution aux études sur les vins rosés méridionaux. I. La couleur, influence sur la dégustation. *Ann. Technol. agric.*, **19** (4), 323-340.

André P., Aubert S., Pelisse C., 1970. Contribution aux études sur les vins rosés méridionaux. II. Importance du cépage sur la couleur et la constitution en matières polyphénoliques. *Ann. Technol. agric.*, **19** (4), 341-351.

André P., Aubert S., 1970. Contribution aux essais de définition légale des vins rosés. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **56** (7), 428-437.

André P., Flanzy C., 1966. La vinification par macération carbonique. *Agriculture audoise* (48), 16-22.

André P., Flanzy C., 1968. La vinification avec macération carbonique. IIe Symposium international d'Œnologie (Bordeaux-Cognac, 13-17 juin 1967). *Ann. Technol. agric.*, n° hors série, 531-550.

Aubert S., 1970. Méthodes usuelles d'évaluation des anthocyanes et tanins dans les vins. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, (690), 107-117.

Aubert S. et Poux C., 1969. Extraction des composée phénoliques du raisin. II. — Taux de passage dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 111-127.

Bénard P., Jouret C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 85-102.

Fauvet J., 1969. La production « Côtes de Provence ». *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **3** (4), 393-400.

Flanzy C., Bénard P., 1971. Méthode de vinification par macération carbonique. Élaboration des vins blancs secs par macération carbonique. *Ann. Technol. agric.* (à paraître).

Hernandez M. R., 1969. Consideraciones cromaticas sobre el efecto de diversos clarificantes ante la preparacion de vinos tipo rosado par la mezcla. *La Semana vitivinicola* (Valencia), **1**, 199-201.

Joslyn M. A., Little A., 1967. Relation of type and concentration of phenolics to the color and stability of rosé wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **3**, 138-148.

Long J., 1964. *La délimitation de l'aire de production des vins des Côtes de Provence.* Publication du Syndicat de défense des « Côtes de Provence », Les Arcs (Var).

Martinière P., Sapis J. C., 1967. Essais de pressurage et de vinification sous atmosphère de gaz carbonique en Bordelais. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, (2), 64-72.

Roson J.-P., 1967. Recherches sur la vinification des vins rosés. *Ann. Technol. agric.*, **16** (3), 227-239.

Schaefffr A., 1968. Modalités de la vinification des vins blancs secs sous atmosphère de gaz carbonique. *Industr. aliment. agric.*, **85**, 1619-1625.

Schwartz J., 1968. La vinification des vins rosés ou rouges d'Alsace. *Les Vins d'Alsace* (France), **7**, 291-298.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 21-34.

LE DOSAGE DES LEUCOANTHOCYANES DANS LES VINS BLANCS (1)

C. POMPÉI (2) C. PÉRI (2), et G MONTEDORO
avec la collaboration technique de E. MINIATI et N. PASQUINI

Istituto di Industrie agrarie, Università di Perugia, 06100 Perugia (Italia)

RÉSUMÉ

On a comparé différents agents de séparation et différentes méthodes de dosage des leucoanthocyanes des vins blancs, et on a étudié les effets de la variation des conditions opératoires sur le rendement et la pureté de la réaction de transformation en cyanidine.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en effectuant le dosage sur les leucoanthocyanes extraites avec du Nylon régénéré et avec du Polyclar AT.

Une méthode standard basée sur l'emploi de ces produits est suggérée.

Les leucoanthocyanes tanins et non tanins peuvent être dosées séparément en appliquant le dosage au précipité obtenu en traitant le vin avec du sulfate de cinchonine, puis au liquide restant.

Mots clés : *Leucoanthocyanes, adsorbants, vins blancs.*

INTRODUCTION

Pour doser les leucoanthocyanes (LA) (flavanes 3-4 diols), on utilise leur propriété de produire des anthocyanidines par chauffage en solutions d'acides minéraux (BATE-SMITH, 1954).

On ne connaît pas encore exactement le mécanisme de cette réaction qui entraîne des réactions de dépolymérisation, de déshydratation et d'oxydation (ROBERTSON, 1959 ; ROUX et BILL, 1959). Cette réaction paraît être favorisée par l'absence d'eau (ROUX et BILL, 1959 ; MASQUELIER, 1963 ; JOSLYN et GOLDSTEIN, 1964) et la présence d'oxygène (FREUDENBERG et WEINGES, 1962) ou de catalyseurs d'oxydation (MCFARLANE, 1961 ; GOVINDARAJAN et MATTHEW, 1965).

Au cours du traitement acide, se produisent certaines réactions parasites de polymérisation des LA elles-mêmes, des catéchines et des produits intermédiaires

(1) Ce travail a été effectué dans le cadre du contrat de recherche n° 69. 01778. 115 du C.N.R. (Consiglio Nazionale delle Ricerche).

(2) Adresse actuelle : Istituto di Tecnologie alimentari, Università di Milano. 20 133 Milano (Italia).

de dégradation, amenant la formation de phlobaphènes, qui interfèrent dans le dosage (HARRIS et RICKETTS, 1959 ; MCFARLANE et SWORD, 1962).

Si on effectue le dosage des LA dans un milieu complexe, tel que le vin, il est nécessaire de les extraire au préalable pour empêcher l'interférence d'autres constituants, même non phénoliques.

A plusieurs reprises, différents auteurs ont conseillé d'employer comme produits adsorbants des résines polyamidiques (Nylon) et le polymère insoluble de la vinylpyrrolidone (Polyclar AT) (HARRIS et RICKETTS, 1959 ; MCFARLANE, 1961 ; MCFARLANE et BAYNE, 1961 ; MASQUELIER, 1963).

Comme milieu de réaction on utilise une solution concentrée d'acide chlorhydrique dans le *n*-butanol (SWAIN et HILLIS, 1959).

Ce travail présente une revue critique des méthodes de dosage des LA dans les vins blancs. Nous avons utilisé différents produits adsorbants et nous avons varié les conditions opératoires d'extraction des LA et de réaction, afin d'obtenir des rendements élevés, des résultats reproductibles et une manipulation facile.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Tous les essais de mise au point de la méthode de dosage ont été effectués sur un vin blanc à teneur moyenne en polyphénols, obtenu par vinification en blanc d'un moût de goutte et de première pression (raisins blancs égrappés, cv. *Trebbiano*).

La reproductibilité de la méthode que nous allons proposer a été vérifiée sur 4 séries de 20 échantillons de vins blancs obtenus au cours d'essais de stabilisation de la couleur pendant deux années et dans deux caves industrielles (CANTARELLI et PALLOTTA, 1970).

Suivant la méthode d'analyse habituelle, on extrait les LA du vin, convenablement dilué, en l'agitant de 10 à 30 mn (POLLOCK *et al.*, 1960 ; MASQUELIER, 1963) avec une quantité d'adsorbant en excès.

La résine est séparée par filtration ou centrifugation, puis rincée à l'eau distillée et transférée dans une solution de ButOH-HCl.

D'après MASQUELIER (1963) on peut améliorer les rendements de la réaction en déshydratant la résine par rinçage à l'éthanol absolu.

La suspension de résine dans le ButOH-HCl est placée dans un tube muni d'un réfrigérant à reflux et plongée dans un bain-marie bouillant pendant 10 à 40 mn, suivant les différents auteurs (HARRIS et RICKETTS, 1959 ; GOVINDARAJAN et MATTHEW, 1965).

Après ce temps, on refroidit le mélange, on le clarifie par centrifugation et on ajuste le volume dans une fiole jaugée.

La détermination de la densité optique (DO) est effectuée à 540 ou 550 nm suivant les auteurs (SWAIN et HILLIS, 1959 ; REYNOLDS *et al.*, 1961 ; GOVINDARAJAN et MATTHEW, 1965), par rapport à un témoin de ButOH-HCl.

Préparation des adsorbants

Nous avons utilisé les produits adsorbants ci-dessous : Nylon APFF (Rhodiatoce) ; Nylonplast APQ/AV (Rhodiatoce) ; Polyamide (Merck) ; Polyclar AT (Gaf Italia).

Le rendement et la sélectivité d'extraction des LA dépendent beaucoup de la position des sites réactifs des produits adsorbants et de la configuration spatiale de la molécule du polymère.

Le Nylon du commerce a une capacité d'adsorption relativement peu élevée. Cela est dû à la formation de liaisons hydrogène entre des molécules voisines, ce qui apporte une diminution des sites réactifs avec le temps (HASLAM, 1966).

Ce phénomène se produit spontanément et rend donc nécessaire un traitement de régénération pour rétablir la capacité d'adsorption intégrale du produit (SINGLETON, 1967) (fig. 1 A).

Un autre avantage de la régénération est de pouvoir employer les résines du commerce même longtemps après leur fabrication.

Nous avons suivi le procédé de régénération suivant (De Villiers, 1961) :

— après rinçage à la soude 5 p. 100 le produit est dissous à chaud dans l'acide formique pur. Cette dissolution provoque la rupture des liaisons intermoléculaires ;

— on fait écouler très lentement la solution dans une grande quantité d'eau distillée maintenue en agitation violente par un appareil Ultraturrax (mod. TP 18/2 ; 20 000 t/mn). Dans cette phase du traitement il y a coagulation de la résine et un premier effilochement du produit solide ;

— on dessèche la pâte obtenue pendant 24 heures à 50°C sous vide ;

— la masse floconneuse desséchée est fragmentée à l'aide d'un homogénéisateur Bühler (mod. DRGM, 40 000 t/mn).

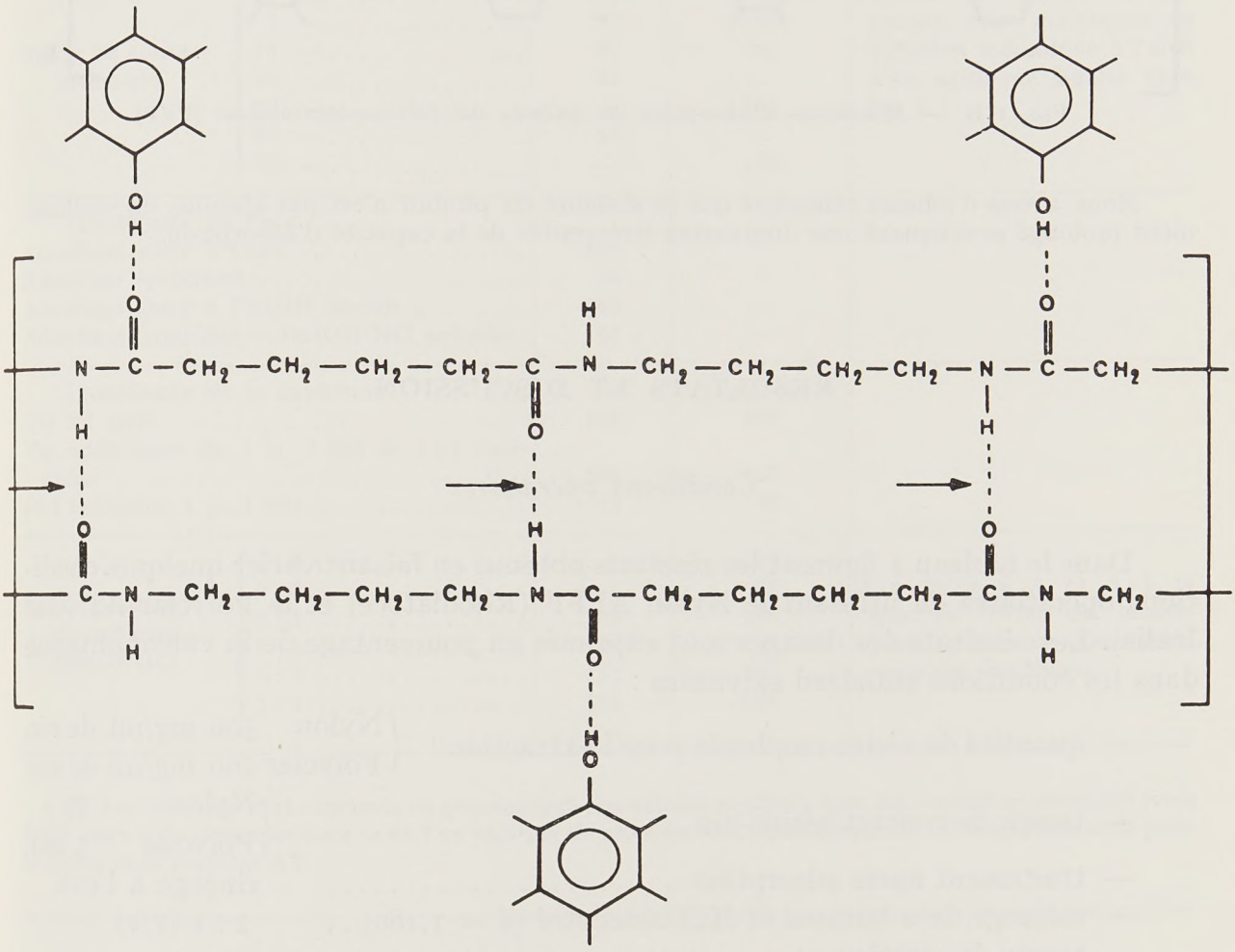


Fig. 1 A. — *Mécanisme d'adsorption des phénols sur polyamide* (Nylon 66). Les flèches indiquent des liaisons hydrogène entre molécules d'adsorbant

Le produit ainsi préparé est employé, avec une très bonne reproductibilité, pendant les sept jours suivant ce traitement.

Les rendements des produits du commerce non traités ont été de 16 p. 100 pour le Nylon APFF (Rhodiatoce) et de 50 p. 100 pour le polyamide Merck, par rapport aux mêmes produits régénérés.

Le Polyclar AT a une capacité d'adsorption très grande par rapport à celle du Nylon (McFarlane et Bayne, 1961 ; McFarlane et Vader Marra, 1962). L'absence d'un H libre lié à l'azote empêche la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires : c'est la raison pour laquelle ce produit reste sous une forme plus « ouverte et accessible » (Singleton, 1967 ; Andersen et Sowers, 1968) (fig. 1 B).

Les traitements de rinçage et de purification peuvent d'ailleurs provoquer l'élimination des polymères de PVP de plus faibles poids moléculaires et donc plus réactifs, ce qui amène une diminution de la capacité d'adsorption.

Dans nos essais, le Polyclar AT rincé avec un mélange de diméthylformamide-méthanol-acide acétique-eau (Gramshaw, 1968) a donné des rendements inférieurs de 40 à 50 p. 100 à ceux du produit du commerce non traité.

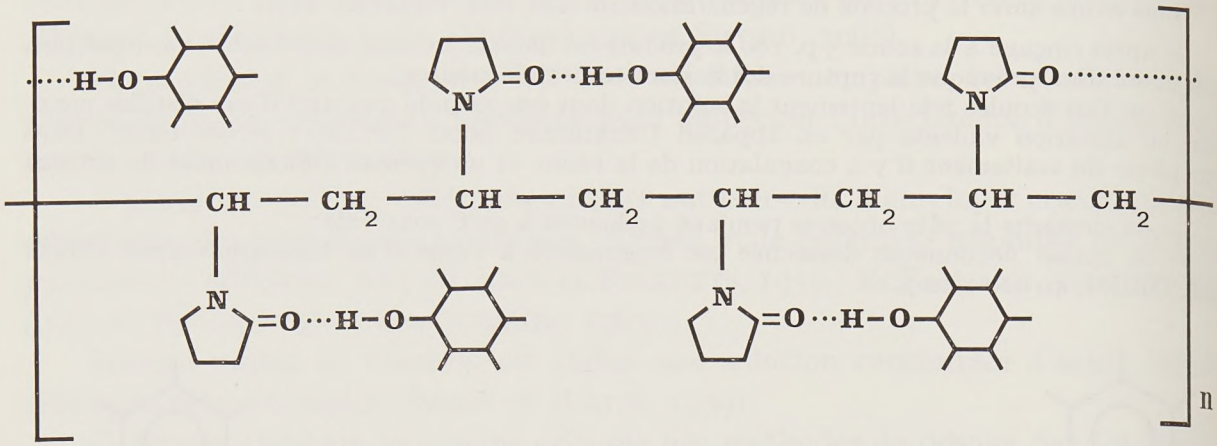


FIG. 1 B. — *Mécanisme d'adsorption des phénols sur polyvinylpyrrolidone* (PVP)

Nous avons d'ailleurs remarqué que la stabilité du produit n'est pas absolue, un vieillissement prolongé provoquant une diminution irréversible de la capacité d'adsorption.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Conditions opératoires

Dans le tableau 1 figurent les résultats obtenus en faisant varier quelques conditions opératoires en utilisant le Nylon APFF (Rhodiatoce) et le Polyclar AT (Gaf Italia). Les résultats des dosages sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue dans les conditions standard suivantes :

— quantité de résine employée pour l'extraction :	Nylon 500 mg/ml de vin Polyclar 200 mg/ml de vin
— temps de contact résine-vin	Nylon 30 s Polyclar 5 mn
— traitement après adsorption	rinçage à l'eau
— mélange de *n*-butanol et HCl concentré ($d = 1{,}186$) ..	2 : 1 (v/v)
— temps de réaction	40 mn

D'après ce tableau on peut observer que :

1. Pour le Nylon, 30 s d'agitation avec le Vortex suffisent pour obtenir un rendement d'extraction près du maximum. Par contre, pour le Polyclar AT, 5 mn semblent nécessaires.

2. Dans les conditions de notre expérience, nous avons obtenu les rendements les plus élevés en employant dans la réaction l'adsorbant rincé à l'eau, sans aucun traitement de déshydratation.

Le rinçage à l'éthanol absolu, suggéré par MASQUELIER (1963), provoque une perte de LA, dosables dans la solution de rinçage et atteignant, dans notre cas, jusqu'à 40 p. 100.

La lyophilisation provoque une baisse de rendement due probablement à des effets d'oxydation des LA adsorbés.

TABLEAU I

Effet des conditions opératoires sur le dosage des leucoanthocyanes extraites du vin par adsorption avec Nylon APFF (Rhodiatoce) et Polyclar AT (Gaf Italia) [1]

Conditions opératoires		Nylon	Polyclar AT	Remarques
Temps de contact résine-vin	30 s	100	92	Pendant le contact la suspension était maintenue en agitation mécanique à l'aide d'un agitateur Bühler type Sm 1.
	1 mn	102	97	
	5 —	97	100	
	15 —	95	96	
	40 —	97	—	
	50 —	—	100	
	60 —	97	—	
	70 —	—	100	
Interférence de l'eau :				
Adsorbant rincé à l'eau		100	—	
Adsorbant lyophilisé		94	—	
Adsorbant rincé à l'EtOH absolu		62	—	
Adsorbant lyophilisé — ButOH-HCl anhydre		60	—	
Interférence de la catéchine :				
Vin tel quel		100	100	
Vin additionné de 1 p. 1 000 de (+) catéchine		101	120	
(+) catéchine 1 p. 1 000		15	31	
Composition du mélange ButOH-HCl	6 : 1 (v/v)	—	82	Aux doses 6 : 1 et 3 : 1 la quantité d'HCl est insuffisante pour une dissolution complète du Nylon.
	3 : 1	—	96	
	2 : 1	100	100	
	3 : 2	108	98	
	6 : 5	112	107	
	1 : 1	114	106	

[1] Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues dans des conditions standard (voir texte page 24), correspondant à 65,7 et 55,5 mg de chlorure de cyanidine p. 100 ml respectivement pour le Nylon et le Polyclar AT.

En employant du BuOH-HCl parfaitement anhydre, préparé à l'appareil de Kipp, le rendement en cyanidine diminue d'environ 40 p. 100.

Contrairement à l'hypothèse formulée par divers auteurs (JOSLYN et GOLDSTEIN, 1964), une faible concentration en eau dans le milieu semble donc améliorer les rendements de la réaction (GOVINDARAJAN et MATTHEW, 1965).

3. La catéchine intervient dans le dosage en produisant, dans les conditions de la réaction, une coloration jaune avec un maximum d'absorption autour de 460 nm (PÉRI, 1967).

Comme on peut le constater d'après le tableau I, et en accord avec les expériences de GRAMSHAW (1968), le Polyclar a une action adsorbante plus nette sur la catéchine.

4. La concentration de l'HCl dans le butanol a une légère influence sur le rendement en anthocyanidine : on obtient des rendements très légèrement supérieurs

TABLEAU 2

Influence de la granulométrie sur les rendements d'extraction des leucoanthocyanes avec le Polyclar AT (Gaf Italia)

Granulométrie mesh	Pourcentage du poids total de Polyclar AT	Chlorure de cyanidine (mg/ml)	Erreur p. 100 (5 déterminations)
> 60	5	70,2	± 2
60-90	15	69,2	± 1
< 90	80	68,3	± 0,9

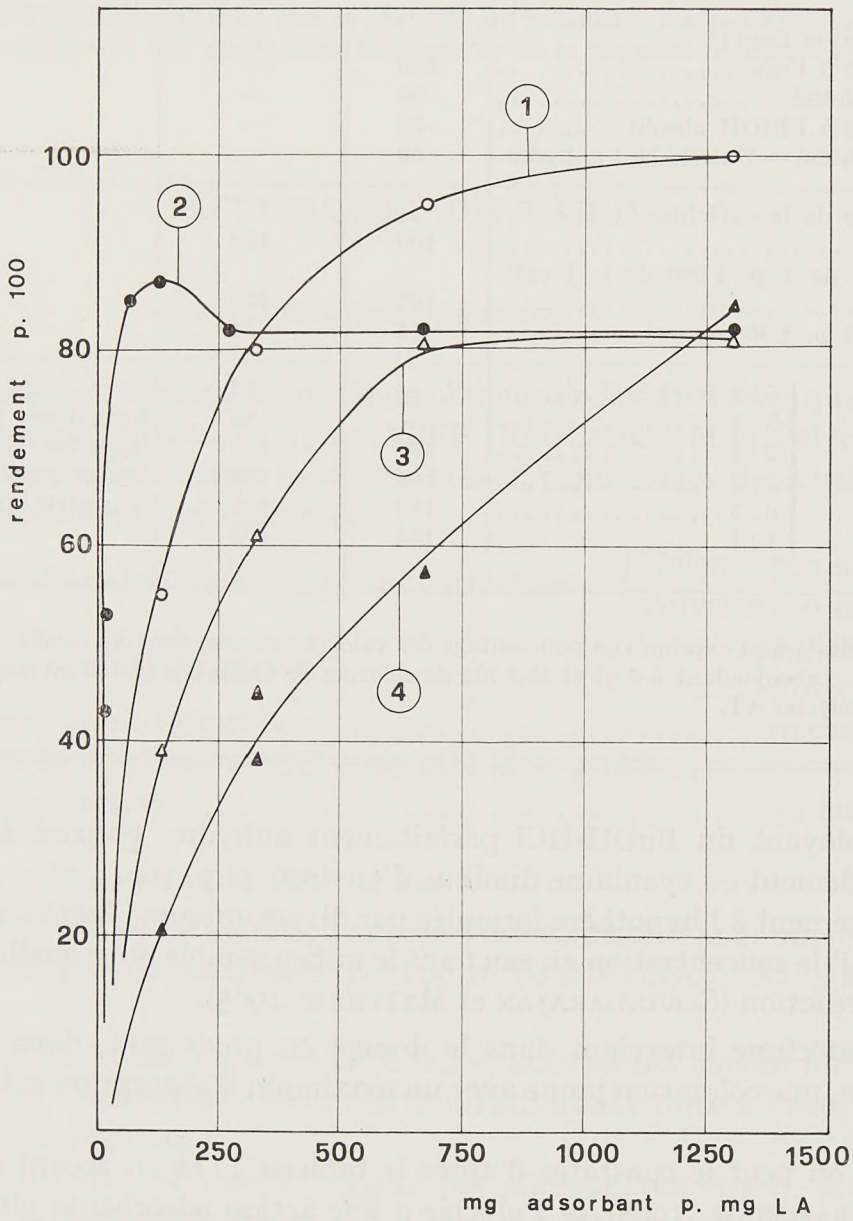


FIG. 2. — *Rendements d'extraction des leucoanthocyanes avec différents produits adsorbants*

1. Nylon APFF (Rhodiatoce)
2. Polyclar AT (Gaf Italia)
3. Nylonplast APQ/AV (Rhodiatoce)
4. Polyamide (Merck)

avec des concentrations de HCl plus élevées. Il convient de noter que lorsque l'on emploie le Nylon comme adsorbant, une concentration élevée de HCl permet une dissolution plus rapide et plus complète de doses élevées de résine.

Granulométrie des produits adsorbants

Lorsque l'on emploie des produits adsorbants du commerce, il peut être important, pour la reproductibilité de la méthode, d'utiliser des produits à granulométrie constante (McFarlane et Bayne, 1961). Nous avons fait des essais-témoins avec des fractions de Polyclar AT (Gaf Italia) à granulométrie variable et obtenu les résultats notés dans le tableau 2.

Le dosage était conduit dans les conditions standard décrites plus haut mais en utilisant comme solvant un mélange de ButOH-HCl (1 : 1, v/v) contenant 150 mg par litre de $FeSO_4$ (Govindarajan et Matthew, 1965).

Comme on peut le voir, l'emploi de différentes fractions ne donne pas de différences notables de rendements ni de reproductibilité. Dans tous les essais de ce travail nous avons, de toute manière, employé la fraction qui passe à travers un tamis de 90 mesh.

Pouvoir adsorbant

Dans la figure 2, nous comparons les pouvoirs adsorbants des différents produits et nous déterminons la dose à employer par mg de LA.

Dans ce graphique, on considère que le contenu réel en LA correspond à la valeur maximale du dosage obtenu avec le Nylon APFF. Les rendements figurent en ordonnées sous forme de pourcentage de cette valeur en fonction des doses de résine employées qui figurent en abscisses et se rapportent à l'unité de poids des LA.

Les deux types de Nylon Rhodiatoce ont un comportement analogue avec un rendement plus élevé pour le type APFF. L'adsorption maximum est obtenue autour de 1 000 mg de résine par mg de LA exprimé comme chlorure de cyanidine. Le polyamide Merck a une capacité d'adsorption sensiblement inférieure et n'atteint le rendement des autres résines qu'à la dose la plus élevée.

Le Polyclar AT a une capacité d'adsorption nettement supérieure avec des doses optimales d'environ 100 mg de polymère par mg de LA.

Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer d'une manière plausible pourquoi le dosage avec le Polyclar a des rendements maximum pour des doses comprises entre 100 et 200 mg de polymère par mg de LA, rendements qui diminuent au-delà de cette valeur.

Conditions d'oxydation

On peut augmenter le rendement de la transformation des LA en anthocyanidines en favorisant les conditions d'oxydation du milieu de réaction, soit en permettant un large contact avec l'oxygène (Peri, 1967), soit en ajoutant des catalyseurs d'oxydation (McFarlane, 1961 ; Govindarajan et Matthew, 1965).

Dans la figure 3 nous avons reporté les augmentations, en fonction du temps, de la DO à 550 nm, obtenue avec le Nylonplast APQ/AV (Rhodiatoce) dans les conditions ci-dessous :

1. suivant le processus habituel ;

2. en présence de $FeSO_4$ (150 mg/l du mélange ButOH-HCl) ;

3. en présence de $FeSO_4$ (même dose) et en faisant barboter de l'air dans le mélange pendant la réaction.

Dans tous les cas, la réaction est à peu près complète au bout de 50 à 60 mn. L'addition de $FeSO_4$ détermine une augmentation de la DO de 20 p. 100. Le barbotage de l'air n'ajoute pas d'effet utile à l'action du $FeSO_4$, mais au contraire il détermine un certain retard dans l'obtention de la DO maximale, dû probablement à un léger effet de refroidissement.

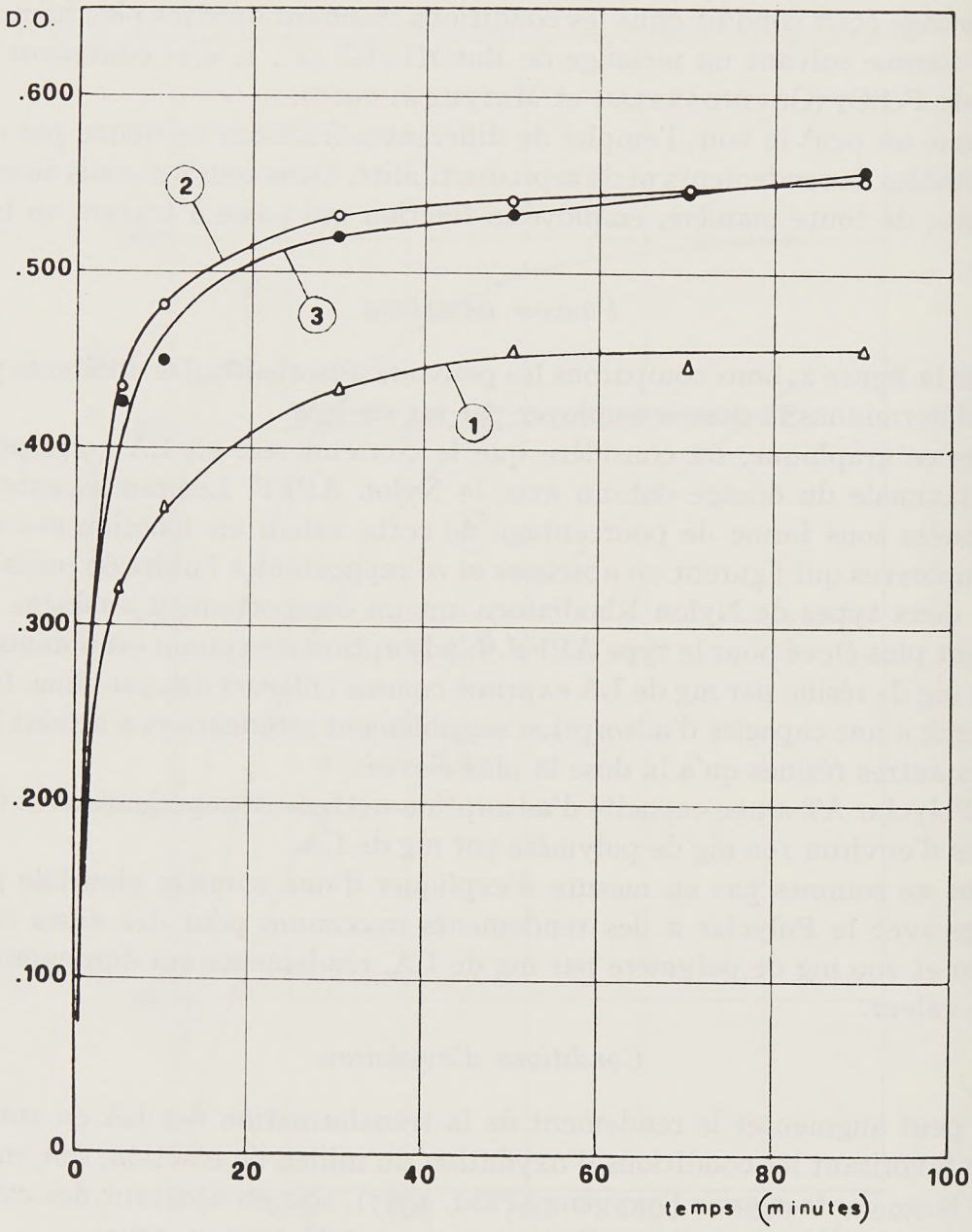


FIG. 3. — *Valeurs de la densité optique* (DO) *à 550 nm obtenues pendant la réaction dans le butanol chlorhydrique* (Nylonplast APQ/AV)

1. Suivant le processus habituel
2. En présence de catalyseur ($FeSO_4$)
3. En présence de catalyseur avec barbotage d'air

Interférences dans le dosage

La méthode de dosage des LA non seulement doit fournir les meilleurs rendements en anthocyanidines, mais aussi doit limiter au maximum la formation de produits secondaires bruns. Une méthode d'évaluation de la pureté des produits de la réaction est la mesure des spectres d'absorption entre 400 et 600 nm (HARRIS et RICKETTS, 1959 ; SWAIN et HILLIS, 1959 ; MC FARLANE et SWORD, 1962 ; GOVINDARAJAN et MATTHEW, 1965 ; GRAMSHAW, 1968).

Une forte absorption aux environs de 460 nm indique généralement la présence de composés bruns et de dérivés de la catéchine (HATHWAY et SEAKINS, 1957).

On a aussi proposé de prendre le rapport DO à 460 nm/DO à 550 nm comme indice relatif de pureté (PÉRI, 1967).

Dans la figure 4 (gauche), la courbe 1 représente le spectre d'absorption des produits de la réaction obtenue en faisant réagir directement le ButOH-HCl avec 1 ml de vin.

L'extraction des LA par des produits adsorbants détermine une nette augmentation du rendement en anthocyanidines et une plus grande pureté du spectre d'absorption.

Dans la figure 4 (droite), on trouve les spectres obtenus dans les mêmes conditions, mais en conduisant la réaction en présence de $FeSO_4$. Il y a une augmentation sen-

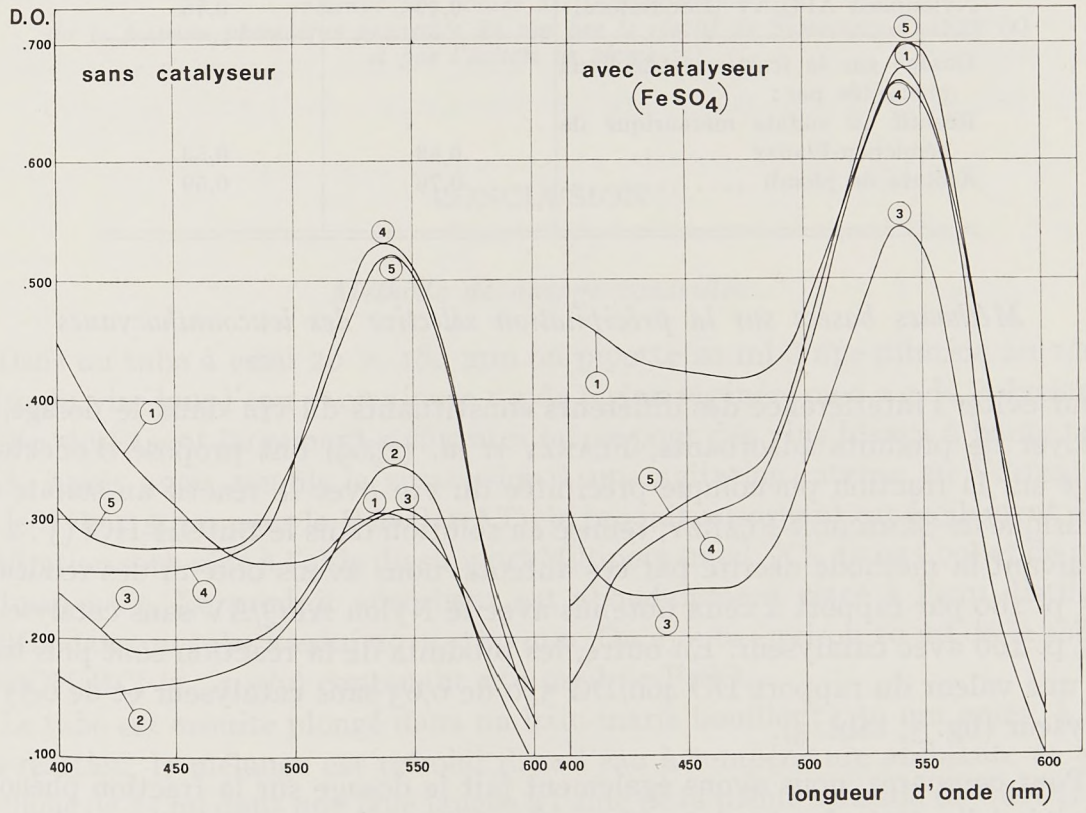


FIG. 4. — *Spectres d'absorption des produits de la réaction obtenus par dosage des leucoanthocyanes sur le vin tel quel et sur la fraction phénolique extraite par différents produits adsorbants*

1. Vin tel quel
2. Polyamide (Merck)
3. Polyclar AT (Gaf Italia)
4. Nylon APFF (Rhodiatoce)
5. Nylonplast APQ/AV (Rhodiatoce)

sible du rendement en anthocyanidines et le rapport DO 460/DO 550 a des valeurs plus basses.

Dans le tableau 3 sont notées les valeurs de ce rapport correspondant aux différents spectres d'absorption.

De tous les produits employés, ce sont les Nylons qui donnent les rendements les plus élevés, suivis du Polyclar AT. Les faibles valeurs des rapports DO 460/DO 550 indiquent qu'avec ces produits il y a une adsorption sélective des LA et une faible formation de composés bruns. Les résultats les moins bons ont été obtenus dans le dosage direct sur le vin.

TABLEAU 3

Valeurs des rapports DO 460 nm/DO 550 nm relatives aux spectres d'absorption des figures 4 et 5

Produit adsorbant	Sans catalyseur	Avec catalyseur ($FeSO_4$)
Vin tel quel	0,87	0,64
Polyamide (Merck)	0,48	—
Polyclar AT (Gaf Italia)	0,64	0,44
Nylon APFF (Rhodiatoce)	0,53	0,45
Nylonplast APQ/AV (Rhodiatoce)	0,49	0,46
Dosage sur la fraction phénolique précipitée par :		
Réactif au sulfate mercurique de Sémichon-Flanzy	0,63	0,53
Acétate de plomb	0,76	0,59

Méthodes basées sur la précipitation sélective des leucoanthocyanes

Pour éviter l'interférence des différents constituants du vin dans le dosage, sans employer de produits adsorbants, FLANZY *et al.* (1969) ont proposé d'effectuer le dosage sur la fraction phénolique précipitée du vin avec le réactif au sulfate acide mercurique de SÉMICHON-FLANZY, remise en solution dans le ButOH-HCl (3 : 2 v/v). En suivant la méthode décrite par ces auteurs, nous avons obtenu des rendements de 65 p. 100 par rapport à ceux obtenus avec le Nylon APQ/AV sans catalyseur, et de 87 p. 100 avec catalyseur. En outre, les produits de la réaction sont plus impurs avec une valeur du rapport DO 460/DO 550 de 0,63 sans catalyseur et de 0,53 avec catalyseur (fig. 5, tabl. 3).

Pour comparer, nous avons également fait le dosage sur la fraction phénolique précipitée à l'acétate de plomb à pH 8,0. Dans ce cas, nous avons obtenu des rendements qui étaient de 67 et de 92 p. 100 par rapport au Nylon APQ/AV, respectivement sans et avec $FeSO_4$. Les produits de réaction sont aussi impurs, avec des valeurs des rapports DO 460/DO 550 de 0,76 sans $FeSO_4$ et de 0,59 avec $FeSO_4$.

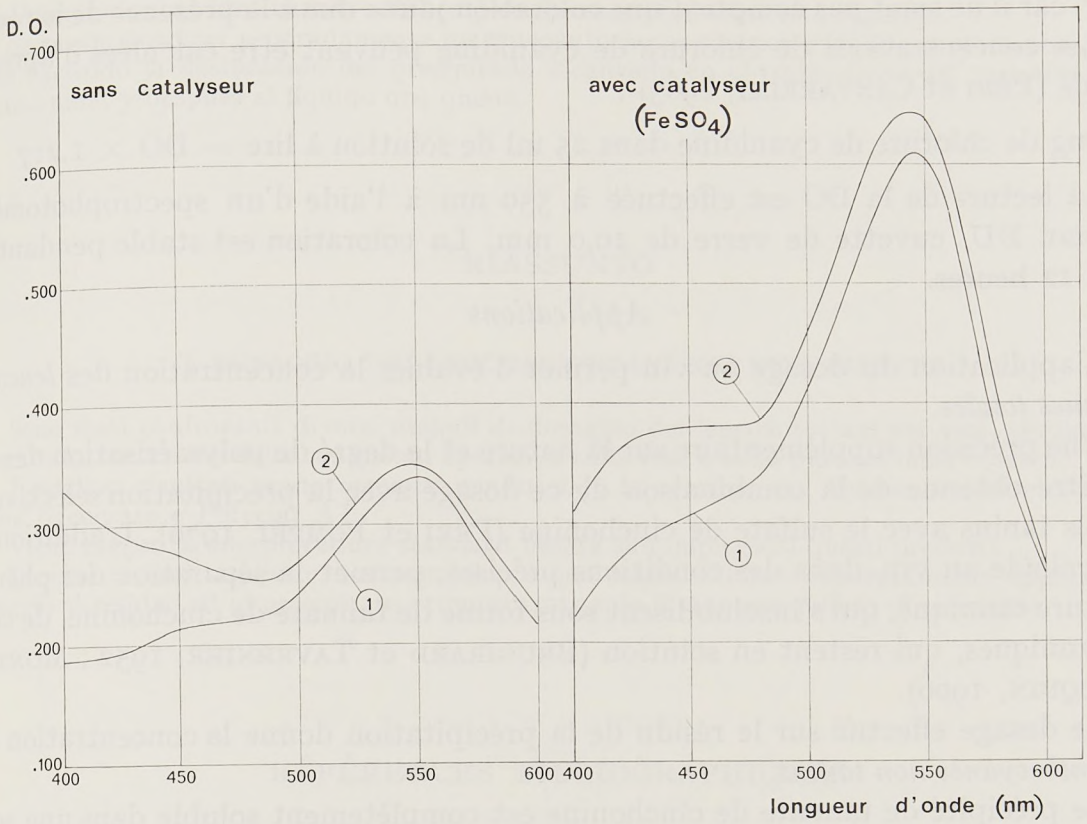


FIG. 5. — *Spectres d'absorption des produits de la réaction obtenus par dosage des leucoanthocyanes sur la fraction phénolique précipitée du vin par le réactif de* SÉMICHON-FLANZY (1) *et par l'acétate de plomb* (2)

CONCLUSION

Méthode de dosage conseillée

Dans un tube à essai 20 × 180 mm on pipette 20 ml d'une dilution au 1/10 ou au 1/20 du vin dans l'eau et on ajoute 1 g de Nylon régénéré ou 0,2 g de Polyclar AT. De telles doses sont largement suffisantes même pour des vins blancs à haute teneur en LA. Après avoir soumis la suspension à une agitation intense au Vortex (30 s pour le Nylon, 5 mn pour le Polyclar AT), le produit adsorbant est facilement séparé par filtration sous vide à l'aide du support Millipore (mod. XX 10 025 00) et de papier Whatman n° 1. Le produit adsorbant est abondamment rincé à l'eau distillée et transféré dans un tube à essai 20 × 180 mm. On ajoute environ 20 ml de la solution de ButOH-HCl (1 : 1 v/v) contenant 150 mg/l de $FeSO_4$.

Le tube est ensuite plongé dans un bain-marie bouillant ; 50 mn après, à la fin de la réaction, le mélange est refroidi dans l'eau à température ambiante et ajusté au volume de 25 ml dans une fiole jaugée à l'aide de la même solution de ButOH-HCl.

Dans le cas du Polyclar AT, il est nécessaire de centrifuger avant d'effectuer la détermination de la DO.

Le témoin est préparé dans des conditions identiques par chauffage de la même quantité de résine dans 20 ml de la solution de ButOH-HCl-$FeSO_4$.

L'emploi conseillé généralement d'un blanc de ButOH-HCl comporte une légère

erreur, car il ne tient pas compte d'une coloration jaune due à la présence de la résine.

Les concentrations de chlorure de cyanidine peuvent être calculées d'après la formule (PÉRI et CANTARELLI, 1963) :

mg de chlorure de cyanidine dans 25 ml de solution à lire = DO × 1,217

La lecture de la DO est effectuée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU, cuvette de verre de 10,0 mm. La coloration est stable pendant au moins 12 heures.

Applications

L'application du dosage au vin permet d'évaluer la concentration des *leucoanthocyanes totales*.

Une précision supplémentaire sur la nature et le degré de polymérisation des LA peut être obtenue de la combinaison de ce dosage avec la précipitation sélective des phénols tanins avec le sulfate de cinchonine (PÉRI et POMPÉI, 1970). L'addition de cet alcaloïde au vin, dans des conditions précises, permet la séparation des phénols de nature tannique, qui s'insolubilisent sous forme de tannate de cinchonine, de ceux non tanniques, qui restent en solution (BRUGIRARD et TAVERNIER, 1952 ; MONTIES et JACQUIN, 1966).

Le dosage effectué sur le résidu de la précipitation donne la concentration des *leucoanthocyanes non tanins*.

Le précipité de tannate de cinchonine est complètement soluble dans une solution de HCl 10 p. 100 dans l'éthanol et peut être utilisé pour le dosage des *leucoanthocyanes tanins*.

La reproductibilité de cette méthode a été vérifiée sur une série d'échantillons de vins blancs à différentes teneurs en LA (CANTARELLI et PALLOTTA, 1970).

Reçu pour publication en décembre 1970.

SUMMARY

THE DOSAGE OF THE LEUCOANTHOCYANINS IN WHITE WINES

Different methods for the dosage of the leucoanthocyanins of white wines have been compared. The effects of the operative conditions on the yield and the specifity of the reaction have been evaluated.

The best results were obtained by carrying out the reaction on the leucoanthocyanins selectively adsorbed on Nylon previously regenerated and on Polyclar AT. A standard procedure based on the use of these products is suggested.

The tannic and non tannic fractions of leucoanthocyanins may be separately evaluated by applying the dosage to the residue and the precipitate obtained by treating the wine with cinchonine sulfate.

RESUMEN

LA DOSIFICACION DE LOS LEUCOANTOCIANOS EN LOS VINOS BLANCOS

Hemos comparado diferentes agentes de separación y diferentes métodos de dosificación de los leucoantocianos de los vinos blancos y hemos estudiado los efectos de la variación de las condiciones operatorias sobre el rendimiento y la pureza de la reacción de transformación en cianidina.

Se logró los mejores resultados al efectuar la dosificación sobre los leucoantocianos extraídos con Nylon regenerado y con Polyclar AT.

Un método standard basado en el empleo de estos productos está sugerido.

Se puede dosificar separadamente los leucoantocianos taninos y los leucoantocianos no taninos haciendo la dosificación del precipitado alcanzado en el tratamiento del vino con sulfato de cinconina, y después al líquido que queda.

RIASSUNTO

IL DOSAGGIO DEI LEUCOANTOCIANI NEI VINI BIANCHI

Sono stati confrontati diversi metodi di dosaggio dei leucoantociani nei vini, studiando gli effetti della variazione delle condizioni operative sulla resa e sulla purezza della reazione.

I migliori risultati erano ottenuti conducendo la reazione sui leucoantociani estratti con Nylon rigenerato e Polyclar AT.

Viene suggerita una procedura standard basata sull'impiego di questi prodotti.

Leucoantociani tannici e non tannici possono essere valutati separatamente applicando il dosaggio al residuo ed al precipitato ottenuti trattando il vino con solfato di cinconina.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSEN R. A., SOWERS J. A., 1968. Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. *Phytochemystry*, **7**, 293-301.

BATE-SMITH E. C., 1954. Leuco-anthocyanins. I. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem. J.*, **58**, 122-125.

BRUGIRARD A., TAVERNIER J., 1952. Les matières tannoïdes dans les cidres et les poirés. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 311-343.

CANTARELLI C., PALLOTTA U., 1970. Stabilizzazione dei vini bianchi. *Relazione al C. N. R.*, Roma.

DE VILLIERS J. P., 1961. The control of browning of white wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **12**, 25-30.

FLANZY M., AUBERT S., MARINOV M., 1969. Nouvelle technique de dosage des tanins leucoanthocyaniques. Applications. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 327-338.

FREUDENBERG K., WEINGES K., 1962. Catechins and flavonoid tannins. In T. A. GEISSMAN, *The chemistry of flavonoid compounds*, 197-216. Pergamon Press, Oxford.

GOVINDARAJAN V. S., MATTHEW A. G., 1965. Anthocyanidins from leucoanthocyanidins. *Phytochemistry*, **4**, 985-988.

GRAMSHAW J. W., 1968. Phenolic constituents of beer and brewing materials. III. Simple anthocyanogens from beer. *J. Inst. Brewing*, **74**, 20-38.

HARRIS G., RICKETTS R. W., 1959. Studies on non-biological haze of beers. VIII. Rapid estimation of anthocyanogens in beer. *J. Inst. Brewing*, **65**, 331-333.

HASLAM E., 1966. *Chemistry of vegetable tannins*, 1-13. Academic Press, London and New York.

HATHWAY D. E., SEAKINS J. W. T., 1957. Autoxidation of polyphenols. III. Autoxidation in neutral aqueous solution of flavans related to catechin. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1562-1566.

JOSLYN M. A., GOLDSTEIN J. L., 1964. Conversion of leucoanthocyanins into the corresponding anthocyanidins. *Science*, **143**, 954-955.

MASQUELIER M. J., 1963. Dosage des leucoanthocyannes du vin blanc, emploi de la poudre de polyamide. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **102**, 51-52.

MCFARLANE W. D., 1961. Determination of anthocyanogens. *J. Inst. Brewing*, **67**, 502-506.

MCFARLANE W. D., BAYNE P. D., 1961. *Studies on the flavonoid compounds in wort and beer*. III. *Adsorption on polymeric resins*. European Brewery Conv. Proc. Congr. 8th, Vienne, 278-285.

MCFARLANE W. D., SWORD P. T., 1962. Determination of anthocyanogens. III. Analysis of barley and malt. *J. Inst. Brewing*, **68**, 344-350.

MC FARLANE W. D., VADER MARRA J., 1962. Determination of anthocyanogens. II. Further studies on analysis of beer. *J. Inst. Brewing*, **68**, 254-257.

MONTIES B., JACQUIN P., 1966. Valeur technologique du dosage des tanins dans les jus de pommes. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 335-347.

PERI C., 1967. Acid degradation of leucoanthocyanidins. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **18**, 168-174.

PÉRI C., CANTARELLI C., 1963. Esame comparativo dell'attività dei detannizzanti proteici e proteico simili. *Vini Ital.*, **26**, 285-294.

PÉRI C., POMPÉI C., 1970. An estimate of different phenolic fractions in wines. Présenté pour la publication. *Amer. J. Enol. Vitic.*

POLLOCK J. R. A., POOL A. A., REYNOLDS T., 1960. Chemical aspects of malting. IX. Anthocyanogens in barley and other cereals and their fate during malting. *J. Inst. Brewing*, **66**, 389-394.

REYNOLDS T., ATTERTON R. M., KIRSOP B. H., POOL A. A. 1961. *Polyphenols in malting and brewing*. European Brewery Conv. Proc. Congr. 8th, Vienne, 267-277.

ROBERTSON A. V., 1959. Mechanism of formation of anthocyanidins from flavan 3.4 diols. *Canad. J. Chem.*, **37**, 1946-1954.

ROUX D. G., BILL M. C., 1959. Mechanism of formation of anthocyanidins from leucoanthocyanidins. *Nature*, London, **183**, 42.

SINGLETON V. L., 1967. Fining-phenolic relationships. *Wines Vines*, **48**, 23-26.

SWAIN T., HILLIS W. E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 63-68.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 35-47.

MÉTHODE DE VINIFICATION PAR MACÉRATION CARBONIQUE

V. — Influence de la hauteur de vendange dans la cuve sur la qualité des vins

P. BÉNARD, M. BURET, C. FLANZY et M. BOURZEIX
avec la collaboration technique de N. Hérédia, J. Lardin, M. Sabatier et A. Solano

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I.N.R.A.,
11 - Narbonne
Station de Technologie des Produits végétaux
Centre de Recherches d'Avignon, I.N.R.A.,
84 - Monfavet

RÉSUMÉ

Au cours d'études sur la vinification par macération carbonique, les auteurs essaient de préciser l'influence de la hauteur de vendange dans la cuve sur la production de jus de goutte et les conséquences de cette production sur la qualité des vins.

Le matériel utilisé comprend d'une part des cuves de même hauteur et de capacités différentes (27 à 81 hl), d'autre part des cuves de même volume (27 hl) et de hauteurs différentes. Les niveaux du moût et de la vendange dans les cuves sont mesurés quotidiennement. Les vins terminés sont analysés et dégustés.

L'augmentation de la hauteur initiale de vendange peut s'accompagner d'une élévation du pourcentage de jus de goutte et du rapport $\frac{\text{hauteur apparente du moût}}{\text{hauteur apparente de la vendange}}$. Des modifications légères, tant sur le plan analytique que sur le plan gustatif, semblent apparaître également dans les vins terminés.

Ces observations peuvent conduire à adopter des formes de cuves différentes selon le type de vin recherché.

Mots clés : *Macération carbonique, qualité.*

INTRODUCTION

Durant la première phase de la vinification par macération carbonique (qualifiée de « phase de fermentation intracellulaire »), les raisins contenus dans une cuve de vinification se présentent sous deux aspects, entiers et écrasés, et sont placés dans deux phases. Finalement on met en œuvre :

1° des raisins entiers placés dans une atmosphère gazeuse anaérobie. Ces baies subissent la fermentation intracellulaire pure ;

2° des raisins écrasés lors de la chute dans la cuve et par tassement ultérieur. Le moût qu'ils libèrent est fermenté par les levures ;

3° des raisins entiers et des rafles baignant dans le moût. Cette fraction de vendange est soumise à l'action de microorganismes exogènes, aux phénomènes de macération et à la fermentation intracellulaire.

Il est possible que les caractères analytiques et gustatifs des vins de macération carbonique soient influencés par la proportion relative de raisins correspondant à chacune des trois catégories. S'il en est ainsi, il paraît alors important de savoir comment orienter cette proportion en fonction du type de vin recherché.

Notre expérimentation menée durant quatre campagnes, 1966 à 1969, a pour but de préciser les relations liant la hauteur de la vendange dans la cuve au pourcentage de raisins écrasés et de vérifier l'influence de cet écrasement sur la qualité des vins obtenus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Principe

Nous désirions suivre au cours du temps les évolutions des hauteurs respectives du moût et de la vendange dans une cuve de macération carbonique. Ces évolutions ont été étudiées en outre en fonction de la hauteur initiale de la vendange à l'encuvage. Enfin, les vins obtenus ont été comparés sur les plans analytique et gustatif.

Matériel

Durant les trois premières années, trois cuves en ciment A, B, C, de même hauteur, sont utilisées. Leur volume respectif est de 27, 54, 81 hl ; la surface de base de A est donc la moitié de celle de B et le tiers de celle de C.

Un tube rigide en chlorure de polyvinyle (Φ = 20 cm ; h = hauteur des cuves), percé de fentes longitudinales, et fixé verticalement au centre de chaque cuve. Une tige de bois, graduée et terminée par un repère mobile de liège, peut être déplacée librement à l'intérieur du tube : elle permet d'apprécier la hauteur du moût dans celui-ci. Une autre tige graduée ayant une embase horizontale (20 × 20 cm) qui repose au même endroit sur la vendange pendant la durée de l'expérience coulisse à l'extérieur du tube. Cette deuxième règle est utilisée pour mesurer le tassement de la vendange. Une planchette horizontale repose sur l'orifice de la cheminée de la cuve et sert de repère de niveau (fig. 1).

En 1969, deux cuves de 27 hl environ sont employées, l'une A en ciment, de 260 cm de haut (base = 100 × 104 cm) et l'autre D métallique, de 130 cm de haut (base = 250 × 86 cm). La cuve D possède deux trappes d'encuvage de façon à permettre une répartition homogène de la vendange et d'obtenir ainsi un « chapeau » horizontal. Les systèmes de mesure des hauteurs de moût et de vendange, décrits ci-dessus, sont installés dans les deux cuves (la cuve D possède un système de mesure à chaque trappe).

Nous admettons que :

1° le niveau de moût dans le tube de drainage correspond au niveau supérieur du moût dans l'ensemble de la cuve ;

2° le tassement de la vendange se fait d'une façon homogène sur toute la surface de la cuve.

Réalisation

L'homogénéisation des lots de vendange se fait selon la technique Bénard-Jouret (1963). Les raisins de *Carignan* noir sont déversés sans foulage dans les cuves préalablement remplies de gaz carbonique. A la fin de l'encuvage, l'atmosphère des cuves est à nouveau saturée de CO_2

Deux mesures des « niveaux » sont réalisées quotidiennement. Les valeurs retenues pour la cuve D correspondent à la moyenne des mesures obtenues pour les deux trappes.

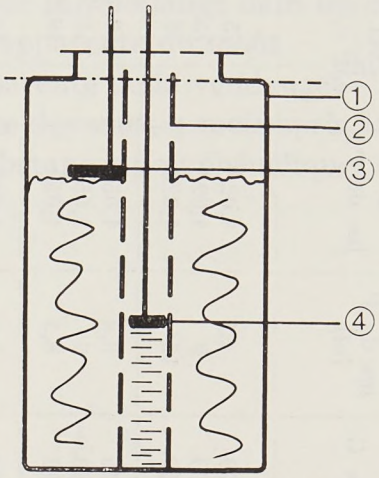


FIG 1. — *Dispositif expérimental*

1. Cuve
2. Tube perforé
3. Indicateur niveau vendange
4. Indicateur niveau moût

En 1966, les trois cuves A, B et C sont entièrement remplies de vendange (tabl. 1). Puisque la hauteur de vendange est la même (260 cm), la différence porte seulement sur la surface de base et la quantité de vendange utilisée. Ces grandeurs varient donc dans les rapports 1, 2 et 3 lorsqu'on passe de A à B puis à C.

En 1967 et en 1968, la même quantité de vendange a été déversée dans chaque cuve. Dans ces conditions la hauteur de vendange dans A est double de celle de B et le triple de celle de C.

En 1969, les deux cuves A et D de même volume (27 hl) sont remplies de vendange. La hauteur de celle-ci est deux fois plus importante dans A (260 cm) que dans D (130 cm).

Discussion sur le dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé de 1966 à 1968 présente deux inconvénients majeurs :

1° alors que la répartition de la vendage se fait par couches sensiblement horizontales dans la cuve A, il est plus difficile d'obtenir une telle distribution dans les cuves B et C. En effet ces dernières, tout en ne disposant que d'une trappe d'encuvage, ont une surface de base plus importante que A ; au remplissage, la vendange a tendance à former un cône de déversement. La mesure de la hauteur de vendange dans la cuve est alors entachée d'erreur. Si, pour pallier cet inconvénient, nous essayons d'égaliser mécaniquement la surface de la vendange, nous blessons certaines baies et augmentons ainsi le volume initial du moût de goutte ;

2° le volume de moût provenant de l'écrasement des baies au cours de l'encuvage croît avec la hauteur de chute. Cette hauteur diminue plus rapidement pour la cuve A que pour la cuve B et *a fortiori* pour la cuve C.

Ces deux contraintes matérielles conduisent donc à fausser l'estimation de la hauteur de vendange dans les cuves de grande surface et à augmenter dans ces récipients le volume de jus obtenu au remplissage. Ceci se vérifie au cours des années 1967 et 1968 où le pourcentage de jus de goutte par rapport au jus total, après décuvage, est à peu près identique dans les trois cuves (tabl. 1).

Aussi, l'étude du facteur principal qui nous intéresse ici sera réalisée sur la base des résultats de 1969. Ces derniers résultats confirment par ailleurs ceux des années précédentes.

RÉSULTATS

L'évolution de la production de jus de goutte et du dégagement de CO_2 au cours de notre expérimentation est représentée figure 2.

TABLEAU I

Conditions de vinification

		Vol. cuve (hl)	Hauteur cuve (cm)	Hauteur vendange (cm)	Surface base cuve (cm^2)	Poids vendange (kg)	Durée cuvaison (jours)	Limite θ (°C)	Volume jus de G (hl)	*d* jus de G	Volume jus de P (hl)	*d* jus de P	p. 100 vol. G / vol. G + P
1966	A	27	260	260	10 360	2 115	9	24,5-29	13,5	1,000	4,5	1,028	75
	B	54	260	260	20 800	4 230	9	25-30,5	27,5	1,000	9	1,028	75
	C	81	260	260	31 000	6 345	9	24,5-30,5	40	1,000	12	1,025	77
1967	A	27	260	260	10 360	2 117	12	18,5-23,5	8,1	1,025	8,3	1,055	49,4
	B	54	260	130	20 800	2 091	12	18,8-23,5	7,5	1,020	9	1,050	45,5
	C	81	260	65	31 000	2 124	12	18,5-23,5	7,9	1,023	8,5	1,050	48,2
1968	A	27	260	260	10 360	2 137	10	20,5-24	9,5	1,002	7,5	1,025	56
	B	54	260	130	20 800	2 137	10	20-24	9,5	1,001	7,4	1,025	56
	C	81	260	65	31 000	2 137	10	20-24	9,5	1,001	7,5	1,025	56
1969	A	27	260	260	10 360	2 262	11	19-23	11,5	1,002	6	1,032	66
	D	27	130	130	21 500	2 263	11	19-22	9	1,005	9	1,035	50

L'évolution de la vitesse de production de jus de goutte et de la vitesse de tassement de la vendange dans les cuves fait l'objet de la figure 3.

L'évolution du niveau de la vendange dans les cuves est représentée figure 4 ; celle du rapport $\frac{\text{hauteur apparente du moût}}{\text{hauteur apparente de la vendange}}$ fait l'objet de la figure 5.

Les résultats de l'analyse des vins, 4 mois après la vinification, sont rassemblés tableau 2 ; l'évolution des substances polyphénoliques est indiquée tableau 3.

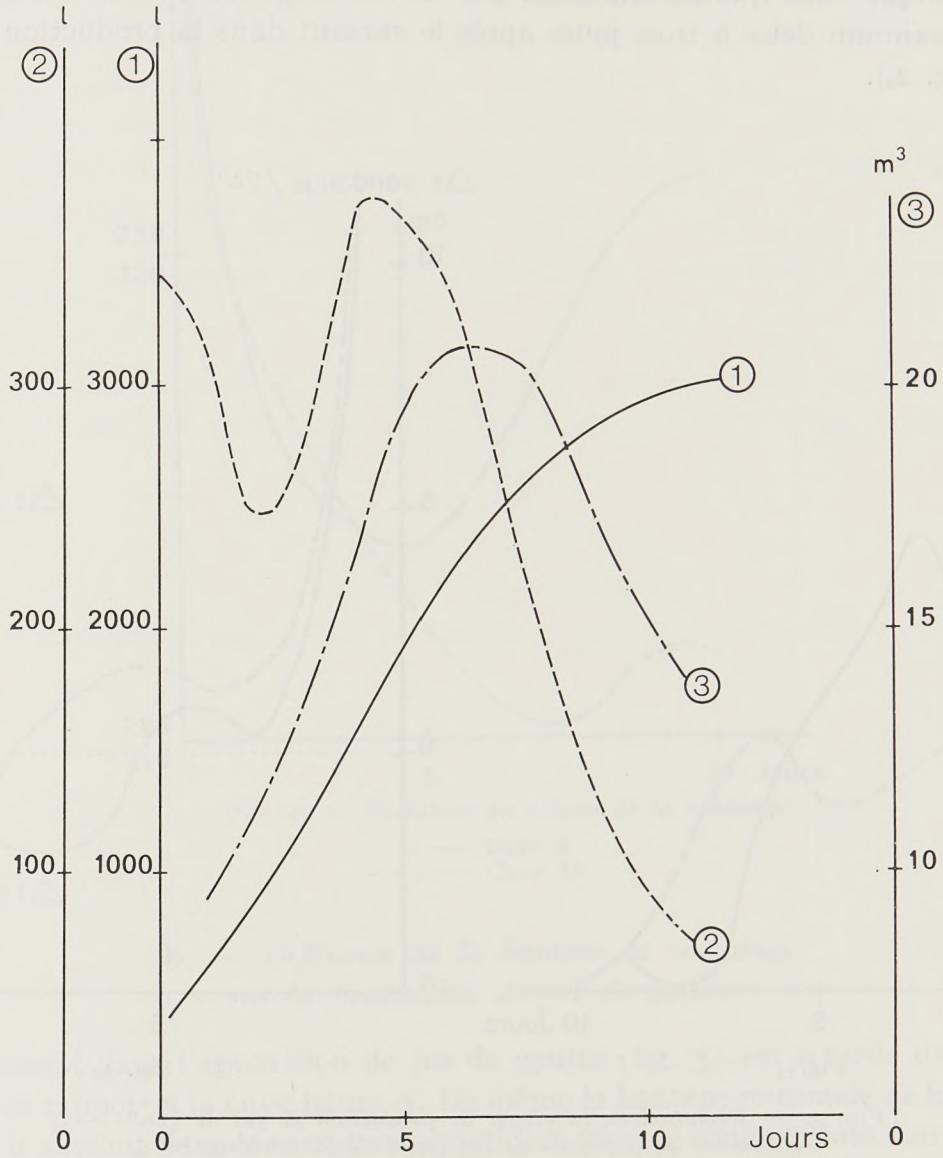


FIG. 2. — *Production de jus de goutte et dégagement de CO_2 dans une cuve de macération carbonique. Cépage* Carignan

1 ———————— : évolution de la production totale de jus de goutte
2 – – – – – – – – : évolution de la production quotidienne de jus de goutte
3 —·—·—·—· : évolution de la production quotidienne de CO_2

DISCUSSION

A. — *Observations générales*

1. — Tout au long de la phase « fermentation intracellulaire » d'une vinification par macération carbonique, la quantité de jus de goutte mesurée dans la cuve

croît quotidiennement (André *et al.*, 1967). Dans notre expérimentation, la cinétique d'accumulation du moût de goutte présente également une allure sigmoïde (fig. 2_1).

La vitesse de production du moût diminue dans les premiers jours, puis s'accroît brusquement, passe par un maximum et diminue jusqu'au décuvage (fig. 2_2). Ce sursaut intervient dans nos essais entre 3 et 8 jours après l'encuvage (fig. 3_1). Le déclenchement du phénomène ne semble pas fonction de la somme de températures subies par la vendange jusqu'à cette date (tabl. 1). Il est normal que le volume de gaz carbonique émis quotidiennement par la vendange (André *et al.*, 1967) passe par un maximum deux à trois jours après le sursaut dans la production de jus de goutte (fig. 2_3).

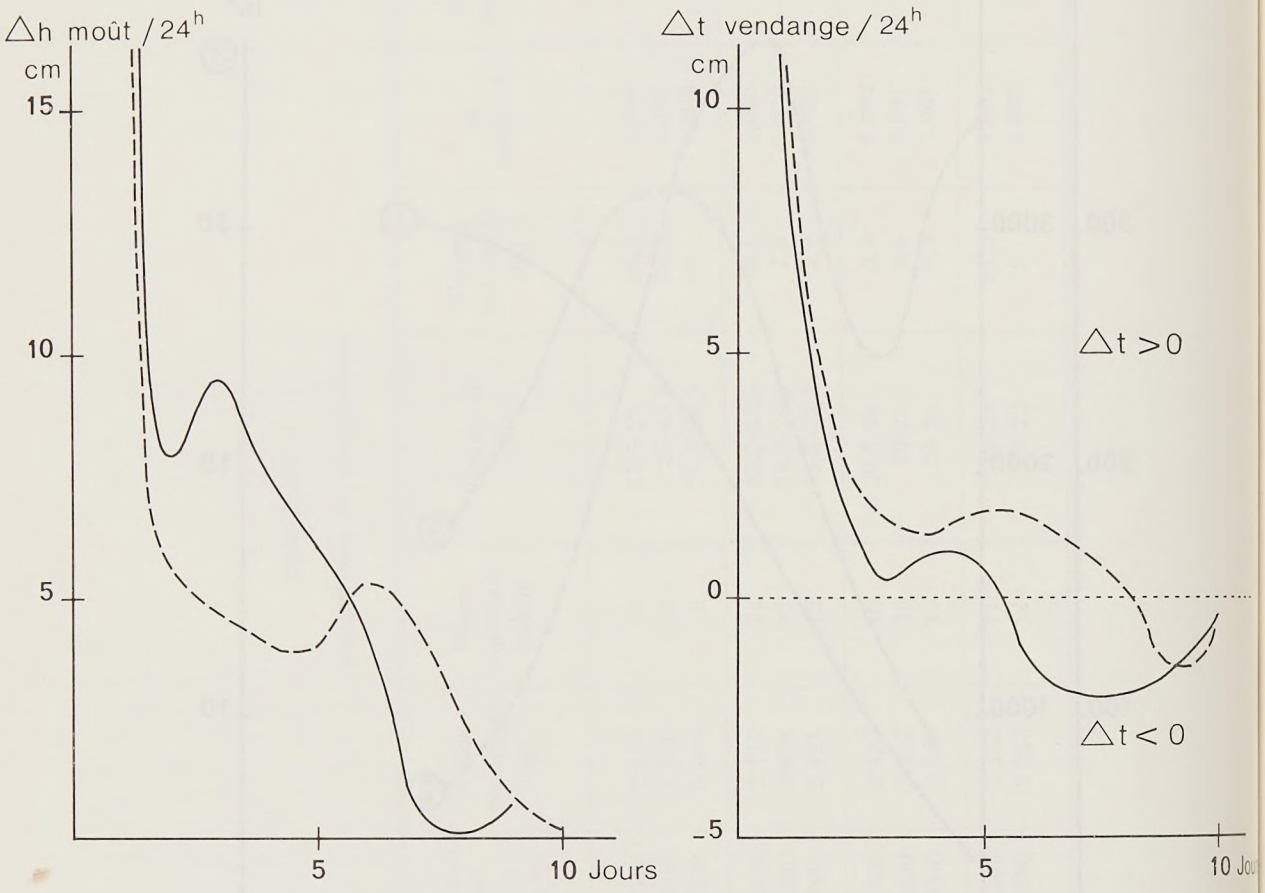


Fig. 3. — *Évolution de la vitesse de production de jus de goutte* — 3_1
Évolution de la vitesse de tassement de la vendange — 3_2

——— Cuve A
– – – – – Cuve D

2. — Au cours d'une première période de la phase « fermentation intracellulaire », la hauteur de vendange dans la cuve diminue d'une façon régulière. Puis, dans une deuxième période, cette hauteur se stabilise ou croît jusqu'au décuvage (fig. 4). La vitesse de tassement (fig. 3_2) suit une évolution sensiblement parallèle à celle de la vitesse de production du moût. Ainsi l'augmentation de la vitesse de tassement intervient approximativement à la même date que l'accroissement de la vitesse d'apparition du moût de goutte (fig. 3_2).

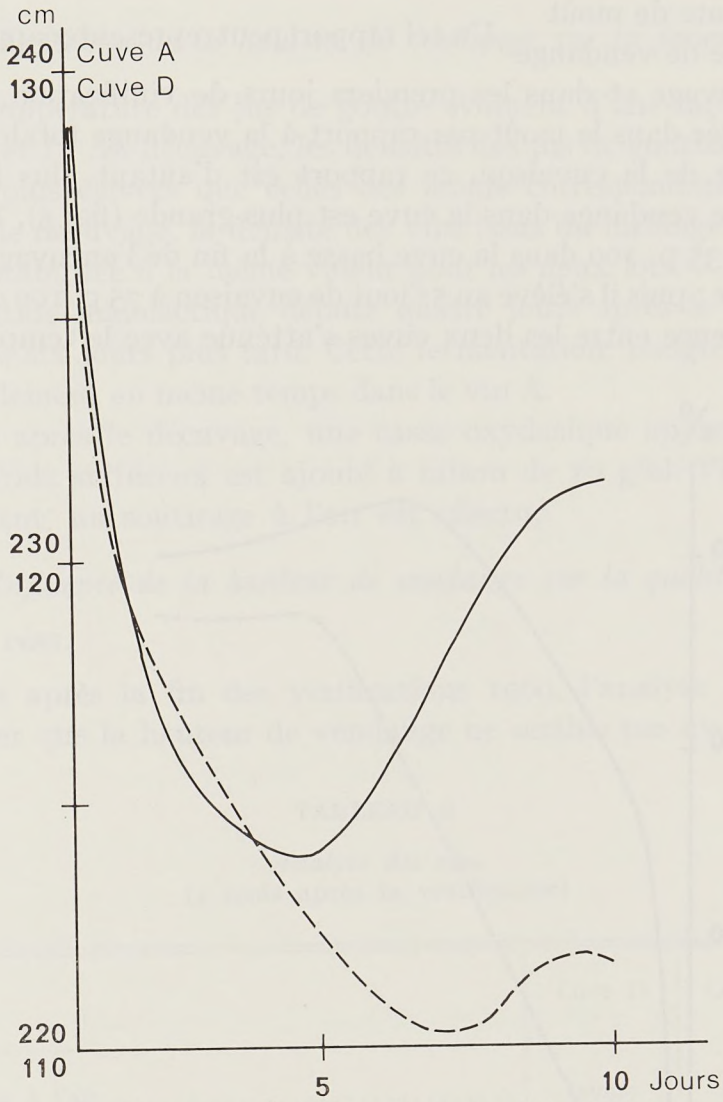


FIG. 4. — *Évolution du niveau de la vendange*
——— Cuve A
- - - - Cuve D

B. — *Influence de la hauteur de vendange sur la production de jus de goutte*

Le ressaut dans l'apparition de jus de goutte (fig. 3_1) est retardé dans la cuve basse D par rapport à la cuve haute A. De même la hauteur minimale de la vendange (fig. 4) et le sursaut dans le tassement quotidien (fig. 3_2) sont atteints dans la cuve D après avoir eu lieu dans la cuve A.

Au décuvage, le pourcentage de jus de goutte par rapport au jus total (goutte + presse) croît avec la hauteur de la vendange. Ainsi, en 1969, le jus de goutte représente 50 p. 100 du jus total pour la cuve D contre 66 p. 100 pour la cuve A. Inversement, en 1966, pour une même hauteur initiale de vendange, la proportion de jus de goutte est sensiblement la même quel que soit le volume de la cuve (tabl. 1).

C. — *Influence de la hauteur de vendange sur la proportion de vendange immergée dans le moût*

Les mesures réalisées permettent de suivre l'évolution quotidienne du rapport

$\frac{\text{hauteur apparente de moût}}{\text{hauteur apparente de vendange}}$. Un tel rapport peut représenter approximativement, à la fin de l'encuvage et dans les premiers jours de vinification, la proportion de vendange immergée dans le moût par rapport à la vendange totale.

Tout au long de la cuvaison, ce rapport est d'autant plus important que la hauteur initiale de vendange dans la cuve est plus grande (fig. 5). Exprimé en pourcentage, il est de 35 p. 100 dans la cuve basse à la fin de l'encuvage contre 51 p.100 dans la cuve haute ; puis il s'élève au 5e jour de cuvaison à 75 p. 100 dans D et 91 p.100 dans A. La différence entre les deux cuves s'atténue avec le temps.

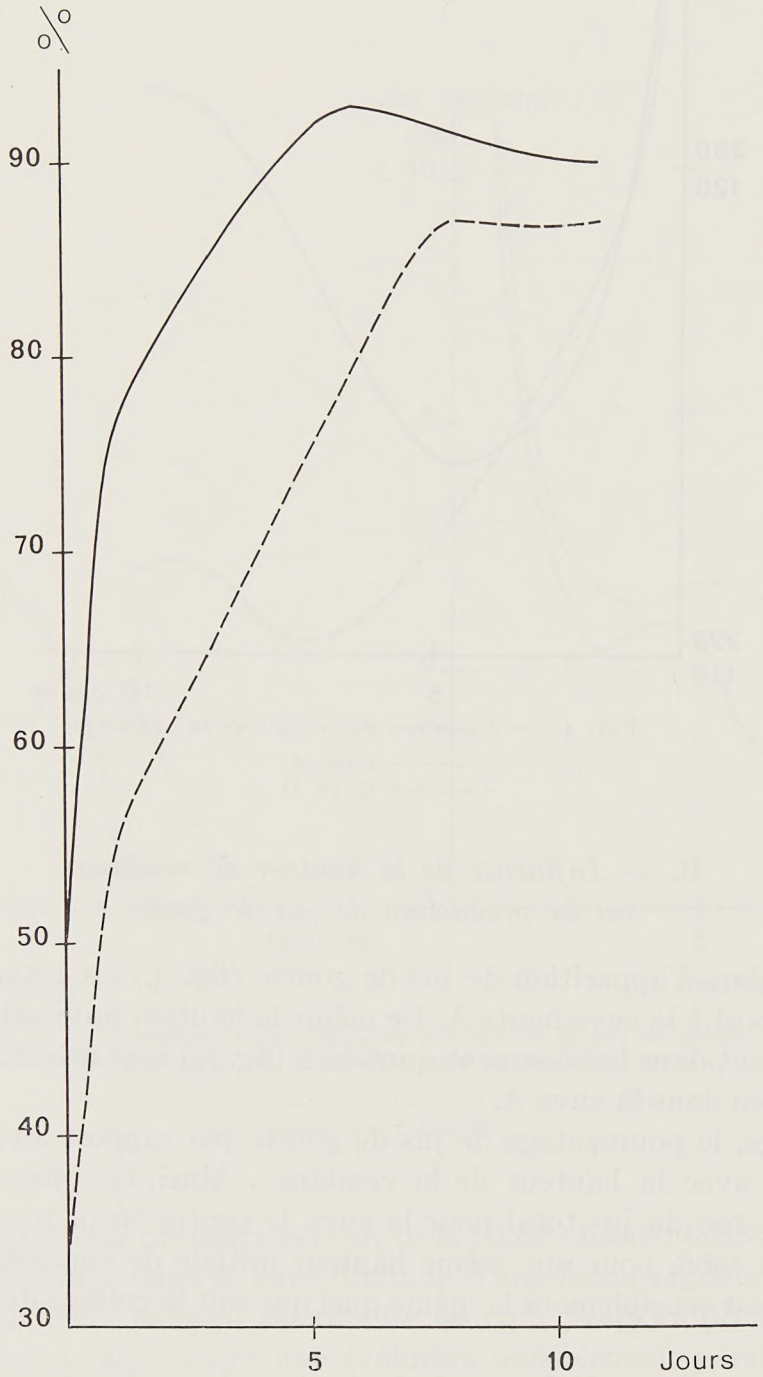


FIG. 5. — *Évolution du rapport :* $\frac{\textit{hauteur apparente du moût}}{\textit{hauteur apparente de la vendange}}$

——— Cuve A

– – – – Cuve D

D. — *Influence de la hauteur de vendange sur la fermentation*

Densité et température des jus de goutte évoluent d'une façon identique dans les deux cuves A et D. Au décuvage, les densités des jus de goutte et de presse de D sont légèrement plus élevées que celles des moûts correspondants de A (tabl. 1). Cinq jours après le décuvage, la densité des vins issus du mélange des jus de goutte et de presse est stabilisée à la même valeur pour les deux lots.

La fermentation malolactique débute quatre jours après le décuvage dans le vin D et s'achève six jours plus tard. Cette fermentation, malgré un retard initial, se termine sensiblement en même temps dans le vin A.

Douze jours après le décuvage, une casse oxydasique apparaît dans les deux vins. De l'anhydride sulfureux est ajouté à raison de 10 g/hl. Vingt-quatre heures après ce traitement, un soutirage à l'air est effectué.

E. — *Influence de la hauteur de vendange sur la qualité du vin*

Composition des vins.

Quatre mois après la fin des vinifications 1969, l'analyse des vins (tabl. 2) permet de vérifier que la hauteur de vendange ne semble pas avoir d'action sur les

TABLEAU 2

Analyse des vins
(4 mois après la vinification)

	Cuve D	Cuve A
Tenue à l'air	bonne	bonne
Degré alcoolique (°GL) à 15°C	12,10	12,10
Densité à 15°C	993,4	993,5
Extrait sec (g/l)	20,75	22,05
Acidité totale (SO_4H_2 g/l)	3,20	2,90
Acidité volatile (SO_4H_2 g/l)	0,36	0,24
Acidité fixe (SO_4H_2 g/l)	2,84	2,66
Acide tartrique (méq/l)	18	18
Fermentation malolactique	faite	faite
pH	3,85	3,87
Cendres (g/l)	2,85	3,16
Alcalinité des cendres (méq/l)	33,75	33,75
Chlore (méq/l)	2,7	3,7
K (après passage sur résine, méq/l)	36,4	37,6
Na (après passage sur résine, méq/l)	1,91	1,86
Ca (après passage sur résine, méq/l)	4,90	3,90
Sucres (Répression des Fraudes, g/l)	1,98	1,84
Glycérol (g/l)	10,21	10,25
Aldéhydes (mg/l)	12,32	12,32
Azote total (mg/l)	98	126
SO_2 libre (mg/l)	51	57
SO_2 total (mg/l)	76	83

Cuve A : volume 27 hl ; surface de base 103,6 cm² ; hauteur 260 cm.
Cuve D : volume 27 hl ; surface de base 215 cm² ; hauteur 130 cm.

fermentations. En effet, degré alcoolique, densité, sucres résiduels, acétaldéhyde, glycérol, présentent des valeurs égales dans les deux vins. La légère élévation de l'acidité volatile dans la cuve D est vraisemblablement due à notre technique de mesure en cours de vinification ; en effet, l'aération provoquée deux fois par jour lors des prélèvements est plus importante dans la cuve à deux trappes et le maintien de la surface de la vendange sous CO_2 est difficile.

Comme cela était prévisible, l'augmentation du contact moût-vendange favorise l'extraction de certains composés. Ainsi, les quantités d'extrait sec, de cendres, de chlore, d'azote total, sont supérieures dans le vin A à celles du vin D. Il en est de même pour les polyphénols.

En revanche, bien que la teneur en acide tartrique soit la même, l'acidité fixe est plus élevée dans D ; ceci est dû à une teneur en cations moins importante.

Évolution des substances polyphénoliques.

L'étude de l'évolution des indices relatifs aux substances polyphénoliques (tabl. 3) provoque certaines remarques.

TABLEAU 3

Évolution des substances polyphénoliques

DO (nm)		520	420	520 + 420	$\frac{520}{420}$	280	$\frac{520}{280}$
Décuvage 16-10-69	A	0,405	0,123	0,528	3,29	1,060	0,38
	D	0,378	0,110	0,488	3,43	0,930	0,41
2-11-69	A	0,394	0,112	0,506	3,52	0,900	0,44
	D	0,367	0,123	0,490	2,98	—	—
13-1-70	A	0,390	0,103	0,493	3,79	0,930	0,42
	D	0,326	0,090	0,416	3,62	0,790	0,41
10-2-70	A	0,390	0,109	0,499	3,52	0,913	0,43
	D	0,323	0,097	0,420	3,33	0,792	0,41
3-3-70	A	0,388	0,108	0,496	3,59	0,915	0,42
	D	0,325	0,094	0,419	3,46	0,790	0,41
22-4-70	A	0,355	0,110	0,465	3,23	0,915	0,39
	D	0,292	0,094	0,386	3,11	0,870	0,34
13-5-70	A	0,361	0,106	0,467	3,41	0,970	0,37
	D	0,294	0,096	0,390	3,06	0,812	0,36

Le vin A présente jusqu'au sixième mois de maturation une intensité colorante (DO 520 + DO 420 nm), une nuance rouge $\left(\frac{\text{DO } 520}{\text{DO } 420}\right)$ et un indice de DO 280 nm nettement supérieurs à ceux de D. Ce dernier indice rend compte, en particulier, de la teneur en matières tannoïdes du milieu.

En cinq mois, les pertes de chromophores rouges (DO 520), de chromophores jaunes (DO 420) et de substances tannoïdes (DO 280) sont plus importantes dans le vin D que dans le vin A.

Il est cependant remarquable que d'octobre 1969 à mai 1970 le rapport $\frac{\text{DO } 520}{\text{DO } 420}$ soit sensiblement le même pour les deux vins. Ce rapport peut dénoter une certaine harmonie du vin (AUBERT, POUX, 1969).

Dégustations.

Quatre techniciens ont effectué une dégustation comparée des vins A et D le 28 mai 1970. Le vin D a paru présenter, pour l'ensemble du jury, une richesse aromatique nettement supérieure à celle du vin A. Dans l'appréciation globale des vins, D est préféré à A par trois dégustateurs sur quatre.

Il semble donc qu'une diminution du contact moût-vendange conduise à une exaltation du potentiel aromatique d'un vin.

CONCLUSIONS

En vinification par macération carbonique, l'accroissement de la hauteur de vendange encuvée peut provoquer :

1° une avance dans l'apparition du phénomène d'accélération de la production quotidienne de jus de goutte ;

2° une élévation du pourcentage de jus de goutte par rapport au jus total, au moment du décuvage ;

3° une augmentation du rapport $\frac{\text{hauteur apparente du moût}}{\text{hauteur apparente de vendange}}$ durant la majeure partie de la cuvaison.

L'extension du contact moût-vendange ne semble pas avoir d'action sensible sur les fermentations alcoolique et malolactique ; en revanche, elle favorise l'extraction de certains composés, ce qui se traduit par des poids d'extrait sec, de cendres, de chlore et d'azote total supérieurs. Parallèlement, le vin est enrichi en substances polyphénoliques et sa nuance rouge est exaltée. Cependant l'indice $\frac{\text{DO } 520}{\text{DO } 280}$ n'est que peu modifié.

La dégustation paraît mettre en évidence une diminution de la richesse aromatique du vin lorsqu'est accru, tout au long de la vinification, le contact phase solide-phase liquide.

Les résultats obtenus semblent donc montrer que la valeur de la hauteur de vendange à l'encuvage influe légèrement sur la qualité des vins élaborés. Ces résultats doivent être confirmés, car ils peuvent conduire à la conception de formes de cuveries adaptées au type de vin recherché.

Enfin, il convient de noter que la production de jus de goutte en macération carbonique n'est pas seulement fonction de la hauteur initiale de vendange, mais est aussi liée à certains facteurs comme le cépage, l'état de maturité, les conditions

climatiques de l'année, les procédés spéciaux de vinification (remontages) ou la température de macération. L'étude de certains de ces facteurs est en cours.

Reçu pour publication en décembre 1970.

SUMMARY

VINIFICATION BY CARBONIC MACERATION
V. — INFLUENCE OF THE HEIGHT OF GRAPES IN THE VAT ON THE QUALITY OF THE WINES

During research work on vinification by carbonic maceration the researchers try to specify the influence of the height of grapes in the vat on the production of juice and the consequences of this production on the quality of the wines.

The equipment used consists on the one hand of vats of equal height and different capacities (27 to 81 hl), and on the other hand vats of equal volume (27 hl) and different heights. The levels of must and grapes in the vats are measured daily. The finished wines are analyzed and tasted.

The increase in the initial height of grapes may be accompanied by a rise in the percentage of juice and the relation : $\frac{\text{apparent height of must}}{\text{apparent height of grapes}}$. Slight modifications, as much from the analytical point of view as from that of tasting, seem to appear also in the finished wines.

These observations may lead to adopt different shapes of vat according to the type of wine wanted.

RESUMEN

METODO DE VINIFICACION CON MACERACION CARBONICA
V. — INFLUENCIA DE LA ALTURA DE LA UVA EN LA CUBA SOBRE LA CALIDAD DE LOS VINOS

Durante el estudio de la vinificacion con maceration carbonica los autores tratan de precisar la influencia de la altura de la uva en la cuba sobre la produccion de mosto de yema y sus consecuencias sobre la calidad del vino.

El material utilizado comprende cubas de altura igual y capacidad diferente (27 a 81 hl) y cubas de volumen igual (27 hl) y altura diferente. Los niveles del mosto y de la uva en las cubas son medidos diariamente. Los vinos, una vez terminados, son analizados y catados.

El aumento de la altura inicial de la uva puede acompanarse de un aumento del porcentaje de mosto de yema y de la proporcion $\frac{\text{altura aparente del mosto}}{\text{altura aparente de la uva}}$. Pequenas modificaciones de la composicion y del gusto ocurren igualmente en los vinos terminados.

Estas observaciones permiten pensar que seria muy conveniente utilizar cubas de forma diferente segun el tipo de vino que se desea obtener.

RIASSUNTO

METODO DI VINIFICAZIONE MEDIANTE MACERAZIONE CARBONICA
V. — INFLUENZA, NELLA VASCA, DELL'ALTEZZA DELLE VENDEMMIA SULLA QUALITÀ DEI VINI

Nel corso degli studi sulla vinificazione mediante macerazione carbonica, gli autori cercano di precisare l'influenza dell'altezza della vendemmia nella vasca sulla produzione del vino fiore e le consequenze di questa produzione sulla qualità dei vini.

Il materiale impiegato comprende da una parte delle vasche aventi la stessa altezza e delle

capacità diverse (da 27 a 81 hl) ,d'altra parte delle vasche aventi lo stesso volume (27 hl) e delle altezze diverse. I livelli del mosto e della vendemmia nelle vasche sono misurate quotidianamente. I vini finiti sono analizzati e degustati.

L'aumento dell'altezza iniziale della vendemmia puó corrispondere a una maggiore percentuale del vino fiore e a un rapporto : $\frac{\text{altezza apparente del mosto}}{\text{altezza apparente della vendemmia}}$ più elevato.

Delle leggere modifiche sia sul piano analitico che su quello gustativo sembrano apparire egualmente nei vini finiti.

Queste osservazioni possono portare ad adottare delle forme di vasche diverse, secondo il tipo di vino ricercato.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Bénard P., Chambroy Y., Flanzy C., Jouret C., 1967 *a*. Méthode de vinification par macération carbonique. I. Production de jus de goutte en vinification par macération carbonique. *Ann. Technol. agric.*, **16** (2), 109-116.

André P., Bénard P., Chambroy Y., Flanzy C., Jouret C., 1967 *b*. Méthode de vinification par macération carbonique. II. La production d'alcool en vinification par macération carbonique. *Ann. Technol. agric.*, **16** (2), 117-123.

Aubert S., Poux C., 1969 *a*. Extraction des composés phénoliques du raisin. I. Technique d'estimation d'une vendange. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 93-109.

Aubert S., Poux C., 1969 *b*. Extraction des composés phénoliques du raisin. II. Taux de passage dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **18** (2), 111-127.

Bénard P., Jouret C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 85-102.

Flanzy C., Buret M., 1970. Fermentation intracellulaire et phénomène de diffusion en anaérobiose liquide. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **56** (7), 422-427.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 49-60.

FIXATION A L'OBSCURITÉ D'ACIDE MALIQUE 3-^{14}C PAR DES BAIES DE RAISIN PLACÉES EN ANAÉROBIOSE

C. FLANZY, M. BURET et Y. CHAMBROY
avec la collaboration technique de Geneviève MIGLIORI et M. TACCHINI

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84 - Montfavet

RÉSUMÉ

Une solution aqueuse d'acide malique 3-^{14}C (45 µCi) est injectée dans 50 baies de raisin *Chasselas* séparées de la rafle. Placées sous argon, à 35°C, à l'obscurité, les baies subissent une fermentation intracellulaire. Après 9 heures d'anaérobiose, elles sont pressurées. Le moût et le marc sont alors fixés indépendamment l'un de l'autre. Les produits réducteurs volatils, le CO_2 dégagé, les sucres réducteurs, les acides organiques non cétoniques, les acides aminés libres et les acides aminés des protides solubles dans le moût, sont dosés séparément ou en groupe.

La radioactivité se retrouve principalement dans les acides organiques, les produits réducteurs volatils, les acides aminés libres. Des filiations malate-succinate, malate-éthanol, semblent exister, ainsi qu'un ensemble métabolique comprenant le succinate et certains acides aminés.

La comparaison des résultats de cet essai avec les résultats de nos expériences d'incorporation de $^{14}CO_2$ conduit à supposer l'existence de compartiments malate dans la baie de raisin.

Mots clés : *Acide malique, raisin, radioactivité, anaérobiose.*

INTRODUCTION

Au cours d'essais antérieurs, nous avons montré que la fermentation intracellulaire des baies de raisin placées en anaérobiose se caractérise, en particulier, par une production d'éthanol (FLANZY et ANDRÉ, 1965) accompagnée d'une diminution de la teneur en malate des baies (FLANZY *et al.*, 1967 *a*, 1967 *b*).

Ces deux phénomènes sont indépendants de toute action microbienne et ne sont dus qu'à l'activité des systèmes enzymatiques des cellules du fruit.

D'autre part, nos essais d'incorporation de $^{14}CO_2$ gazeux, à l'obscurité, par des raisins soumis à des conditions d'anaérobiose stricte, ont montré que le malate est

l'un des premiers substrats radioactifs formés et que la radioactivité de cet acide, comparée à celle des autres substrats, est quantitativement la plus importante (FLANZY *et al.*, 1968, 1969).

Ces faits suggèrent que le métabolisme de l'acide malique doit être très actif au cours de la fermentation intracellulaire des baies de raisin plongées dans une atmosphère de CO_2 ; de telles conditions sont réalisées pratiquement dans la vinification par macération carbonique. Aussi, afin de préciser le métabolisme de cet acide, avons-nous procédé à une incorporation d'acide malique 3-^{14}C

$$COOH-{}^{14}CH_2-CHOH-COOH.$$

Nous avons suivi, au cours de la fermentation intracellulaire (9 h d'anaérobiose), le devenir du Carbone numéro 3 du malate.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Cinquante baies de raisin *Chasselas*, mûres et saines, sont séparées du pédicelle au ras du bourrelet. Ces baies, après lavage à l'eau bidistillée et séchage sur papier-filtre, forment un lot de 156 g.

Méthode expérimentale

L'échantillon de 50 baies (volume : 145 ml) est introduit dans une enceinte (550 ml) dont l'atmosphère est saturée d'argon. L'enceinte est ensuite placée dans une chambre noire thermostatée à 35°C. Après deux heures d'anaérobiose, le récipient est ouvert et chaque baie reçoit 10 µl d'une solution aqueuse d'acide *d-l*-malique 3-^{14}C. Les 500 µl (50 × 10 µl) de solution aqueuse incorporée contiennent environ 3 µM d'acide *d-l*-malique 3-^{14}C dont la radioactivité totale est de 45 µCi et la radioactivité spécifique de 15 mCi/mM.

Chaque baie est incisée au scalpel jusqu'au parenchyme. Une bande de papier-filtre est insérée dans la blessure et absorbe le moût qui s'en écoule. Puis, l'extrémité de l'aiguille d'une microseringue, contenant 10 µl de solution radioactive, est enfoncée, entre les lèvres de l'incision, dans le parenchyme. L'injection réalisée, la plaie est obturée par de la paraffine chaude (60-70°C), répartie au moyen d'une spatule. Les grains sont remis dans l'enceinte qui est à nouveau remplie d'argon. Une extrémité du dispositif expérimental débouche dans un flacon contenant de la soude N/10. A la fin de 9 heures supplémentaires d'anaérobiose, un balayage par de l'argon permet de piéger le CO_2 résiduel de l'enceinte dans la soude N/10. Les baies sont alors prélevées pour analyses.

Méthodes d'analyse

La paraffine est enlevée et les baies sont pressurées. Le moût est centrifugé durant 10 minutes à 1 500 *g* à la température de la glace fondante. Le surnageant est divisé en deux parties aliquotes : l'une conservée à — 25°C est destinée à la détermination de l'éthanol, l'autre fixée par l'alcool bouillant sert à l'analyse des acides organiques, des acides aminés et des sucres réducteurs. Le marc et le culot de centrifugation sont réunis puis fixés par l'alcool bouillant. Les techniques de mesure des radioactivités et de dosage des acides organiques, acides aminés, sucres réducteurs, éthanol, ont été décrites précédemment (FLANZY *et al.*, 1968, 1969).

Justifications

L'anaérobiose de l'atmosphère de l'enceinte est réalisée par l'argon et non par le CO_2, de façon à éviter une dilution du $^{14}CO_2$ dégagé par les baies.

L'incorporation a lieu deux heures après le début de l'anaérobiose afin que la fermentation intracellulaire soit nettement commencée. Cette fermentation intracellulaire dure neuf heures après l'incorporation pour que, d'une part, ses effets soient suffisamment sensibles (production d'éthanol) et que, d'autre part, les échanges isotopiques soient réduits.

RÉSULTATS

La radioactivité totale récupérée dans l'ensemble des différentes fractions analysées représente environ 40 p. 100 de la radioactivité théorique injectée (tabl. 1). Cette radioactivité « récupérée » est distribuée principalement dans le groupe « composés acides et neutres » du moût (72 p. 100) et du marc (19 p. 100). Les radioactivités des produits réducteurs volatils, des acides aminés libres de l'hydrolysat du moût, du CO_2, sont nettement plus faibles (tabl. 1). Dans le moût, la radioactivité récupérée, après séparation des différents substrats du groupe « composés acides et neutres », est retrouvée dans le malate (81 p. 100), le succinate (3 p. 100), les sucres réducteurs (1,5 p. 100), le citrate, le tartrate. Ces pourcentages sont sensiblement les mêmes dans la fraction marc (tabl. 2).

TABLEAU I

Incorporation d'acide malique 3-^{14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose : distribution de la radioactivité dans les différentes fractions séparées.

	RT mesurée (ipm · 10^3)	RT récupérée en p. 100
Malate apporté	99 900	
Total récupéré	40 230	100
$^{14}CO_2$	100	0,25
Produits réducteurs volatils	2 550	6,00
Moût : acides organiques + sucres	29 000	72,00
Moût : acides aminés libres	860	2,00
Moût : acides aminés protéiques	210	0,50
Marc : acides organiques + sucres	7 600	19,00

RT = radioactivité totale rapportée à 50 baies.

Les autoradiogrammes des fractions moût et marc se sont révélés positifs pour le malate, le succinate, les groupes acides aminés neutres et acides aminés acides séparés par électrophorèse, le γ-aminobutyrate, l'aspartate, le glutamate, l'alanine.

En outre, dans la fraction moût, une radioactivité est décelée dans l'acide pyrrolidone-5-carboxylique, la thréonine et dans deux corps dont la nature est inconnue le premier se situe au niveau de sortie du fumarique en chromatographie de partage

TABLEAU 2

Incorporation d'acide malique 3-^{14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose : distribution de la radioactivité dans différents substrats.

Substrat	Moût			Marc			Hydrolyse du moût
	µM	RT (ipm × 10^3)	RS (ipm/µM)	µM	RT (ipm × 10^3)	RS (ipm/µM)	RT (ipm × 10^3)
Acide malique	972	15 200	15 700	525	5 512	10 500	
Acide citrique	10	26	2 600	30	11	370	
Acide succinique	77	564	7 300	42	196	4 670	
Acide tartrique	1 932	27	14	2 050	8	4	
Acide pyrrolidone carboxylique	84	82	980				
Acide shikimique				23	16	680	
Acide glutamique	39	5,4	140				
Acide aspartique	13	0,6	50				
Acides aminés basiques		7,5	0				0
Acides aminés neutres		194	9,4				3,6
Acides aminés acides		11,5	12				0
Sucres réducteurs	160 000	280	2				
Produits réducteurs volatils (éthanol)	2 600	2 550	974				

RT et RS = radioactivités totales et spécifiques rapportées à 50 baies. µM = micromole.

sur gel de silice ; le deuxième, élué à l'emplacement de l'acide shikimique en chromatographie d'échange d'ions (Dowex 1, $HCOO^-$), présente un spot de Rf plus élevé que celui de cet acide en chromatographie de partage sur papier. En revanche, dans la fraction marc le fumarate apparaît radioactif et des traces de radioactivité sont retrouvées dans la proline.

Des pertes en substrats et en radioactivité se sont normalement produites au cours des manipulations successives. C'est ainsi que la radioactivité totale de l'ensemble des acides aminés libres a fortement diminué après lyophilisation. Les résultats obtenus par électrophorèse et chromatographie sur papier de lyophilisats ne servent donc qu'à repérer l'importance relative de la radioactivité totale des différents groupes d'acides aminés ou de quelques acides aminés pris séparément.

DISCUSSION

Relation malate → produits réducteurs volatils

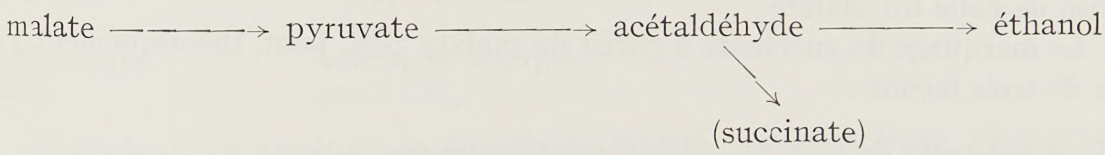
Après 9 heures d'anaérobiose, les produits réducteurs volatils, en majeure partie formés d'éthanol, présentent une radioactivité totale et une radioactivité spécifique relativement élevées. Ce fait suggère l'existence, au cours de la fermentation intracellulaire des baies de raisin, d'une voie plus ou moins directe de synthèse d'éthanol à partir du malate. Cependant, il convient de noter que :

— d'une part, la quantité d'éthanol néoformée est nettement plus importante que la quantité de malate présent dans le milieu et, *a fortiori*, que la quantité de malate dégradée ;

— d'autre part, la radioactivité spécifique de l'éthanol est à la fois très inférieure à celle du malate et très supérieure à celle des sucres réducteurs.

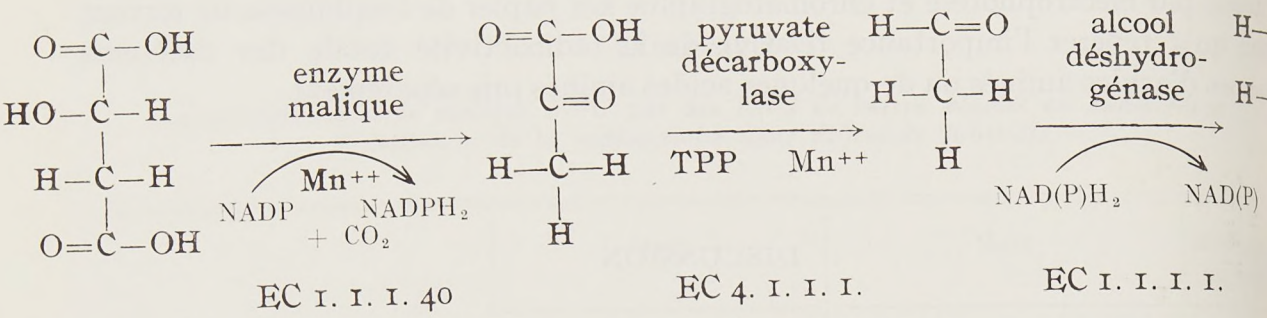
L'éthanol radioactif issu du malate 3-^{14}C semble ainsi dilué dans de l'alcool non (ou peu) radioactif synthétisé par une autre voie, glycolytique probablement. Ces considérations rejoignent nos conclusions précédentes sur la production d'éthanol dans des baies de raisin au cours d'une fermentation intracellulaire réalisée après incorporation de $^{14}CO_2$ (Flanzy *et al.*, 1969). Cette production doit être la résultante de deux phénomènes. Le premier, quantitativement le plus important, correspondrait à la fermentation alcoolique normale. Le second utiliserait, à partir de l'un des premiers produits néoformés avec le $^{14}CO_2$ (le malate par exemple), une voie faisant intervenir des substrats différents de ceux de la glycolyse.

Ranson (1953) a envisagé l'éventualité d'une filiation :



dans des tissus végétaux (Kalanchoë, carotte, coléoptile d'avoine) placés dans une atmosphère enrichie en CO_2. Cette hypothèse a été évoquée par Peynaud et Guimberteau (1962) pour le raisin au cours de sa fermentation intracellulaire. D'autre part, Clijsters (1965) affirme que la production d'éthanol dans la pomme à partir de malate ne peut s'effectuer, au contraire, qu'en présence d'oxygène. De même, Rhodes, Wooltorton et Hulme (1969) montrent que le système de « décarboxylation du malate » impliqué dans la respiration climactérique des pommes est inhibé

par de trop faibles tensions d'oxygène (2 p. 100). Ces derniers auteurs schématisent ainsi la voie de décarboxylation du malate :



L'incompatibilité entre l'hypothèse formulée par RANSON (1953) et les observations de CLIJSTERS (1965), RHODES *et al.* (1969) sur la nécessité d'une concentration minimum d'oxygène pour le fonctionnement de la voie malate-éthanol risque de n'être qu'apparente.

En effet, par analogie avec l'action de l'éthylène sur le déclenchement de la maturation (MAPSON, 1970), il pourrait exister un facteur réprimant, dans le fruit non mûr, qui provoquerait un besoin d'oxygène pour l'utilisation d'une telle voie. La répression cessant avec la maturité, la filiation malate-éthanol se déroulerait alors en anaérobiose.

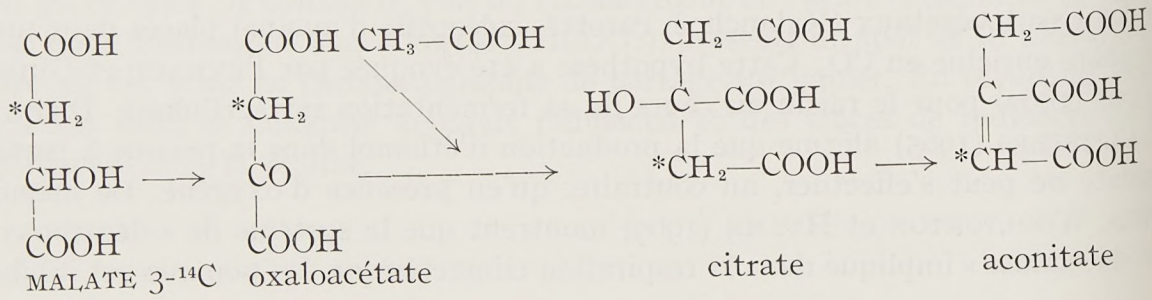
Notre essai montre, de toute façon, que la radioactivité retrouvée dans des baies ayant reçu une injection d'acide malique radioactif est localisée, après un temps relativement court d'anaérobiose et dans une proportion non négligeable, dans les produits réducteurs volatils. L'étude des différentes séquences métaboliques pouvant conduire du malate à l'éthanol est en cours. Notons que l'une des enzymes de cette voie, l'enzyme malique (EC 1. 1. 1. 40) a déjà été mise en évidence dans le raisin (MEYNHARDT, 1965).

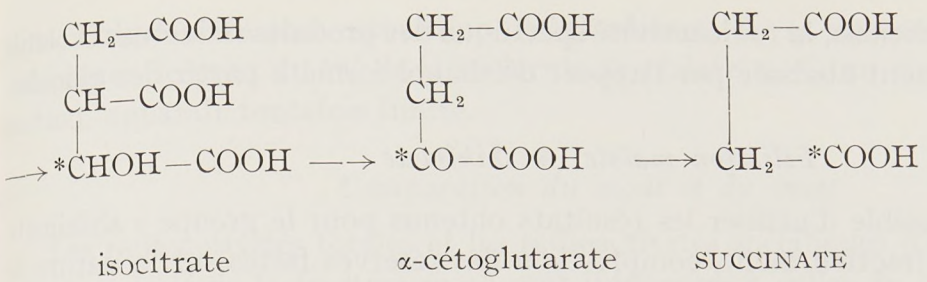
Filiation malate → succinate

L'existence d'une voie de transformation du malate en succinate dans les fruits placés en anaérobiose et mis en présence de $^{14}CO_2$ a fait l'objet de controverses (RANSON, 1953 ; ULRICH et LANDRY, 1956 ; WILLIAMS et PATTERSON, 1964). Nos résultats expérimentaux montrent que la radioactivité spécifique du succinate, après incorporation d'acide malique 3-^{14}C, est élevée. Elle représente approximativement la moitié de celle du malate.

Le marquage du succinate à partir du malate 3-^{14}C peut, théoriquement, s'effectuer de trois façons :

1. *Voie habituelle du cycle des acides tricarboxyliques.*



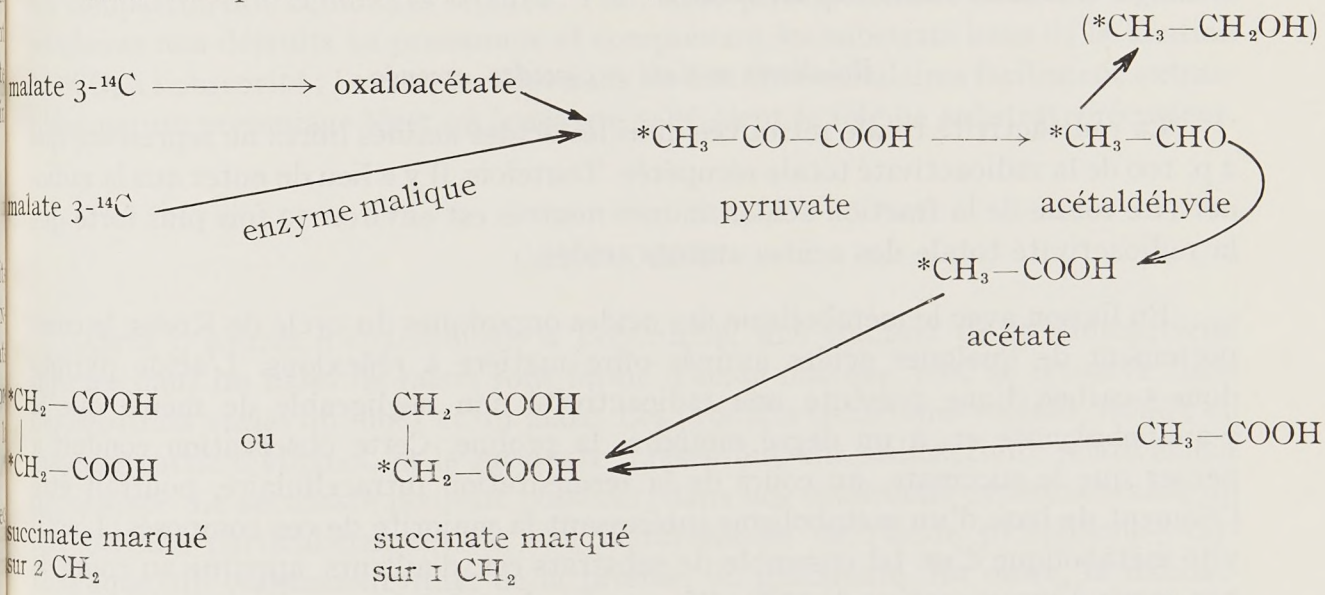


Or, la radioactivité spécifique du citrate est inférieure à celle du succinate. Donc une telle voie serait à écarter, car selon McLennan, Beevers et Harley (1963) un précurseur doit avoir une radioactivité spécifique supérieure ou au moins égale à celle du substrat qui lui succède dans une chaîne métabolique se déroulant dans un même site cellulaire.

2. *Voie empruntant le sens inverse de celui du cycle de Krebs* et conduisant à des formes de plus en plus réduites : malate, fumarate, succinate. Dans notre essai, la radioactivité spécifique du fumarate n'est pas déterminée puisque cet acide se trouve mélangé à un composé de nature indéterminée ; aussi l'existence du schéma métabolique ci-dessus ne peut-elle être ni infirmée ni confirmée. Il convient cependant de noter que, dans le cas d'une anaérobiose stricte par le CO_2, la succinodéshydrogénase (EC 1.3.99.1) serait inhibée (Ranson, Walker et Clarke, 1957) et le passage fumarate → succinate ne pourrait alors se faire.

3. *Voie faisant intervenir, en fin de chaîne métabolique, une réaction de Thunberg.*

Cette voie pourrait débuter de deux façons :



Cependant, en anaérobiose, le passage malate → oxaloacétate, réaction d'oxydation, apparaît difficile et il est alors vraisemblable que la première séquence de cette voie se ferait par l'intermédiaire de l'enzyme malique.

L'existence d'un tel schéma peut être mise en doute, car la radioactivité spécifique de l'éthanol (autre substrat synthétisé au moyen de cette voie métabolique) est 7 fois plus faible que la radioactivité spécifique du succinate. Néanmoins, le marquage différentiel de l'éthanol et du succinate à partir du malate 3-^{14}C peut résulter de l'existence présumée de compartiments malate dans les baies de raisin (Flanzy *et al.*,

1969). Dans ces conditions, la radioactivité spécifique des produits réducteurs volatils pourrait être fortement abaissée par l'apport d'éthanol formé à partir des glucides.

Filiation malate → shikimate

Il n'est pas possible d'utiliser les résultats obtenus pour le groupe « shikimate + inconnu » de la fraction moût, compte tenu des réserves faites sur la nature de ces corps. En revanche, les données recueillies à partir du marc montrent que le shikimate possède une radioactivité spécifique relativement forte. Ce résultat rejoint ceux obtenus après incorporation de $^{14}CO_2$ (FLANZY *et al.*, 1969). En effet, une synthèse active de shikimate radioactif se produit au cours de la fermentation intracellulaire puisque la radioactivité spécifique de l'acide synthétisé à partir du $^{14}CO_2$ gazeux présente un fort coefficient d'augmentation entre 5 heures et 6 jours d'anaérobiose. Du fait que le $^{14}CO_2$ se retrouve de manière prédominante dans le malate, existe-t-il alors une filiation assez directe malate → shikimate ? Nous ne pouvons actuellement donner de réponse à cette question qui présente un intérêt certain étant donné le rôle de précurseur joué par le groupe shikimate-quinate à l'égard de quelques composés aminés aromatiques.

Relations malate → citrate et malate — tartrate

La biosynthèse du citrate à partir du malate est faible, ainsi que le montrent les radioactivités spécifiques et totales du citrate. Elle devient négligeable pour le tartrate qui ne semble pas directement concerné par le métabolisme du malate au cours de la fermentation intracellulaire.

Relations malate — acides aminés

La radioactivité totale retrouvée dans les acides aminés libres ne représente que 2 p. 100 de la radioactivité totale récupérée. Toutefois, il y a lieu de noter que la radioactivité totale de la fraction acides aminés neutres est environ 20 fois plus forte que la radioactivité totale des acides aminés acides.

En liaison avec le métabolisme des acides organiques du cycle de Krebs, le comportement de quelques acides aminés offre matière à réflexions. L'acide pyrrolidone-5-carboxylique présente une radioactivité non négligeable de même que le γ-aminobutyrate et, à un degré moindre, la proline. Cette observation conduit à penser que le succinate, au cours de la fermentation intracellulaire, pourrait être l'élément de base d'un métabolisme intéressant la majorité de ces composés. L'activité métabolique d'un tel ensemble de substrats est, d'ailleurs, apparue au cours de nos essais d'incorporation de $^{14}CO_2$ (FLANZY *et al.*, 1969).

Relation malate 3-^{14}C → $^{14}CO_2$

Au cours de cet essai, la radioactivité récupérée sous forme de $Na_2{}^{14}CO_3$ est minime (0,25 p. 100) et la radioactivité spécifique du carbonate est faible. Il faut noter, cependant, que la très faible valeur de cette radioactivité est due en partie à la technique de comptage. En effet, les mesures de radioactivité de la solution sodique de $Na_2{}^{14}CO_3$ ont été effectuées dans des conditions où l'autoabsorption était impor-

tante. Malgré cette sous-estimation de la radioactivité et une possibilité d'échanges isotopiques, le rejet du ^{14}C de la molécule de malate 3-^{14}C, au cours de sa métabolisation, apparaît toutefois limité.

Comparaison du moût et du marc

Les radioactivités totales et les radioactivités spécifiques d'un acide organique déterminé isolé de la fraction marc sont inférieures à celles du même acide présent dans la fraction moût : ainsi, les radioactivités totales du succinate et du malate isolés du marc ne représentent que 35 à 36 p. 100 de celles des mêmes acides séparés du moût. De même, les radioactivités spécifiques de ces acides dans le marc n'atteignent que 64 à 66 p. 100 de leurs valeurs dans le moût. La présence de radioactivités spécifiques dans le marc inférieures à celles trouvées pour les mêmes acides dans le moût suggère que le substrat radioactif (malate 3-^{14}C) injecté dans les baies a diffusé lentement dans des structures cellulaires épargnées au pressurage et donc retrouvées dans la fraction marc.

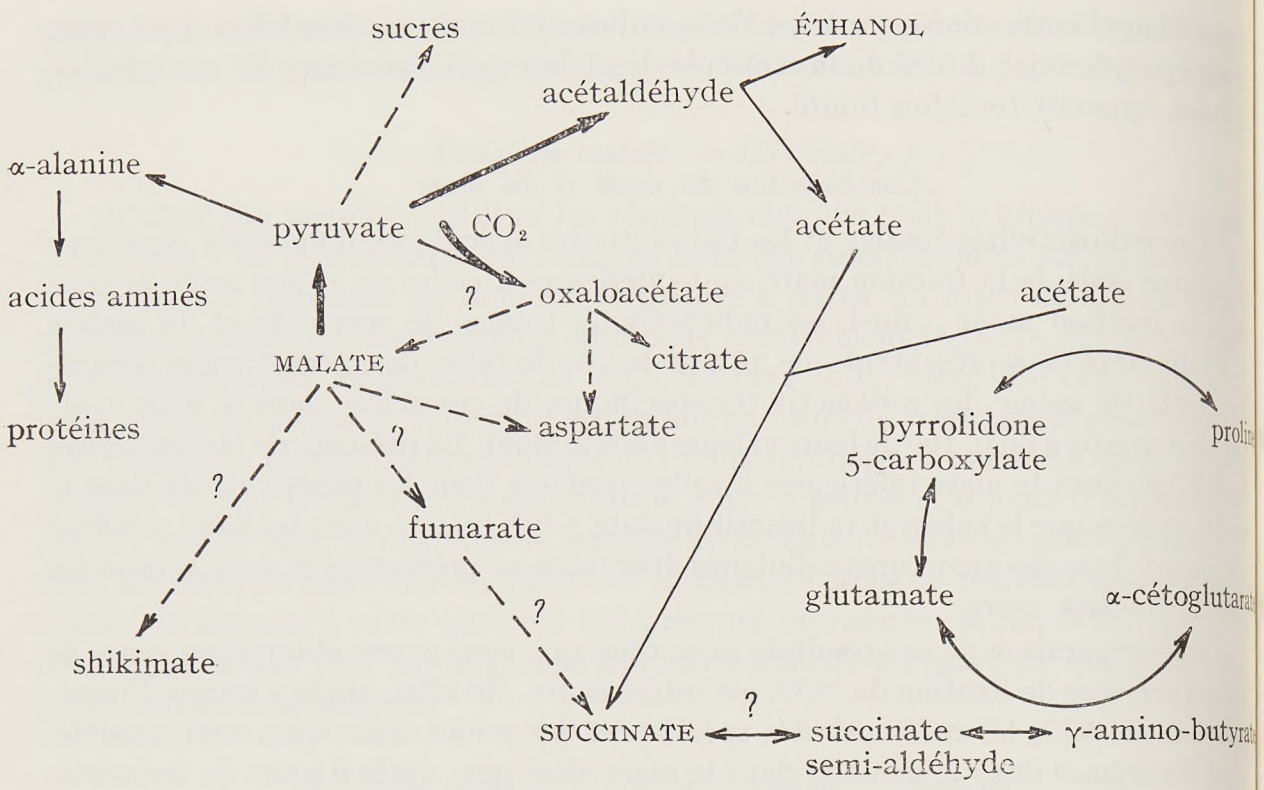
La comparaison de ces résultats avec ceux que nous avons obtenus au cours de nos expériences de fixation de $^{14}CO_2$ est intéressante. En effet, après 5 heures d'incorporation de $^{14}CO_2$ les radioactivités spécifiques des acides organiques sont sensiblement les mêmes dans le moût et dans le marc alors que, après 6 jours de fermentation intracellulaire, les radioactivités spécifiques des acides du marc deviennent très supérieures à celles des acides homologues du moût.

Les différences rencontrées entre ces deux types d'incorporation ($^{14}CO_2$ et malate 3-^{14}C) peuvent impliquer l'existence de deux métabolismes différents dans des compartiments cellulaires séparés : l'un, situé principalement dans des organites cellulaires non détruits au pressurage et comprenant les substrats issus de la fixation de $^{14}CO_2$ à l'obscurité ; l'autre, localisé dans les fractions cellulaires facilement extractibles par un pressurage léger où le malate 3-^{14}C tient le rôle de substrat précurseur.

CONCLUSION

Après 9 heures d'anaérobiose, à l'obscurité, une fraction de la radioactivité injectée dans les baies de raisin sous forme d'acide malique 3-^{14}C se retrouve dans des substrats variés du moût et du marc. Les produits réducteurs volatils, formés en majeure partie d'éthanol, et le succinate, présentent une radioactivité relativement importante. Le succinate pourrait posséder, dans nos conditions expérimentales, un métabolisme particulièrement lié aux métabolismes de l'acide pyrrolidone-5-carboxylique, du γ-aminobutyrate, de la proline, du glutamate. En outre, la radioactivité des acides aminés neutres, quoique faible, est nettement supérieure à celle des acides aminés acides. La radioactivité spécifique des sucres et la radioactivité totale du citrate sont minimes. Au cours de la fermentation intracellulaire, le métabolisme du tartrate n'est pas en relation avec la dégradation du malate. L'existence de compartiments malate dans la baie de raisin apparaît vraisemblable.

Ci-dessous sont schématisées les possibilités de filiation qui apparaissent à l'issue de ce travail (en traits pleins, les réactions accélérées ; en pointillés, les réactions ralenties).



Actuellement, nous essayons de vérifier l'existence des voies métaboliques ainsi proposées, en utilisant des techniques d'inhibition et de dégradation moléculaire associées à la recherche des systèmes enzymatiques impliqués dans ces métabolismes.

Reçu pour publication en décembre 1970.

SUMMARY

FIXING OF 3-^{14}C MALIC ACID IN DARKNESS BY GRAPES IN ANAEROBIOSIS

An aqueous solution of 3-^{14}C malic acid (45 μCi) is injected into 50 *Chasselas* grapes separated from the stalk. Placed in argon, at 35°C, in darkness, the grapes undergo intracellular fermentation. After 9 hours of anaerobiosis, they are pressed. The must and the pomace are then fixed independently from each other. The volatile reducing products, released CO_2, reducing sugars, non ketonic organic acids, free amino acids and amino acids of soluble protides in the must are dosed separately or as a group.

Radioactivity is found mainly in the organic acids, volatile reducing products and free amino acids. Malate-succinate, malate-ethanol relationships seem to exist as well as a metabolic ensemble comprising succinate and certain amino acids.

The comparison of the results of this test together with the results of our experiments of incorporation of $^{14}CO_2$ lead to the assumption of the existence of malate chambers in the grape.

RESUMEN

FIJACION DE ACIDO MALICO 3-^{14}C EN GRANOS DE UVA, EN CONDICIONES DE ANAEROBIOSIS Y OBSCURIDAD

A 50 granos de uva *Chasselas* separados del escobajo se les ha injectado une solucion acuosa de acido malico 3-^{14}C (45 μCi). Luego los granos han sido colorados en una atmosfera de argon, a 35°C, en la obscuridad. En ellos se ha observado una fermentacion intra-celular.

Despues de 9 horas de anaerobiosis los granos han sido prensados. El mosto y el orujo han sido fijados separadamente. Los productos reductores volatiles, el CO_2 liberado, los azucares reductores, los acidos organicos no cetonicos, los amino-acidos libres y los amino-acidos de los protidos solubles en el mosto han sido dosados o por grupo.

La radioactividad se encuentra principalmente en los acidos organicos, en los productos reductores volatiles y en los amino-acidos libres. Filiaciones malato-succinato y malato-etanol parecen existir asimismo que un conjunto metabolico comprenoliendo el succinate y ciertos amino-acidos.

La comparacion de los resultados de este ensayo con los resultados de nuestras experiencias de incorporacion de $^{14}CO_2$ conducen a suponer la existencia de compartimientos malato en el grano de uva.

RIASSUNTO

FISSAGGIO NELL'OSCURITA DI ACIDO MALICO 3-^{14}C MEDIANTE BACCHE D'UVA POSTE IN ANAEROBIOSI

Una soluzione acquosa di acido malico 3-^{14}C (45 μCi) viene iniettata in 50 bacche d'uva *Chasselas* separate dal graspo. Poste sotto argon, a 35°C, nell'oscurità, le bacche subiscono una fermentazione intra-cellulare. Dopo 9 ore d'anaerobiosi, esse sono spremute. Il mosto e la vinaccia vengono allora fissati indipendentemente l'uno dall' altra. I prodotti riducenti volatili, il CO_2 prodotto, gli zuccheri riducenti, gli acidi organici non cetonici, gli amminoacidi liberi e gli amminoacidi dei protidi solubili nel mosto, vengono dosati separatamente o in gruppo.

La radioattività si ritrova principalmente negli acidi organici, nei prodotti riducenti volatili e negli amminoacidi liberi. Sembra che esistano delle filiazioni malato-succinato, malato-etanolo e un insieme metabolico comprendente il succinato e alcuni amminoacidi.

Il confronto dei risultati di questa prova con quelli dei nostri esperimenti d'incorporazione di $^{14}CO_2$, ci porta a supporre che nella bacca dell'uva esistano dei compartimenti malato.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Clijsters H., 1965. Malic acid metabolism and initiation of the internal breakdown in *Jonathan* apples. *Physiol. Plant.*, **18**, 85-94.

Flanzy C., André P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 173-178.

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967 *a*. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. I. Influence de la température. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 27-34.

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967 *b*. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 89-107.

Flanzy C., Flanzy M., André P., Chambroy Y., 1968. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin, en anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 287-297.

Flanzy C., Flanzy M., André P., Chambroy Y., 1969. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose. II. Devenir du ^{14}C au cours de la fermentation intracellulaire. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 307-325.

McLennan D. H., Beevers H., Harley J. L., 1963. « Compartimentation » of acids in plant tissues. *Biochem. J.*, **89**, 316-327.

Mapson L. W., 1970. La biosynthèse de l'éthylène et la maturation des fruits. *Endeavour*, **29**, 29-33.

Meynhardt J. T., 1965. Biosynthesis of dicarboxylic acids through carbon dioxide fixation by an enzyme extract from *Barlinka* grape berries. *S. Afr. J. agric. Sci.*, **8**, 381-392.

Peynaud E., Guimberteau G., 1962. Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 161-167.

Ranson S. L., 1953. Zymasis and metabolism of acids in higher plants. *Nature*, London, **172**, 252-253.

Ranson S. L., Walker D. A., Clarke I. D., 1957. The inhibition of succinic oxidase by high carbon dioxide concentrations. *Biochem. J.*, **66**, 57 p.

RHODES M. J. C., WOOLTORTON L. S. C., HULME A. C., 1969. Some enzyme systems involved in ripening of apples. *Qual. Plant. Materiae veg.*, **19**, 167-183.

ULRICH R., LANDRY Jacqueline, 1956. Formation d'acides organiques dans les fruits conservés en atmosphère riche en gaz carbonique. *C. R. Acad. Sci.*, **242**, 2757-2759.

WILLIAMS M. W., PATTERSON M. E., 1964. Non volatil organic acids and core breakdown of *Bartlett* pears. *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 80-83.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 61-73.

ÉTUDE DE L'ACTION DES AMYLASES ALPHA ET BÊTA SUR L'AMIDON IRRADIÉ PAR RAYONNEMENT GAMMA (1)

Marie-Thérèse TOLLIER et A. GUILBOT

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés,
I. N. R. A. — C. E. R. D. I. A.,
91 - Massy

RÉSUMÉ

L'évolution de l'allure des alpha- et bêta-amylolyses, à l'état cru, de l'amidon de pomme de terre et de l'amidon de maïs a été suivie en fonction des conditions d'irradiation de ces produits.

L'étude a été faite, d'une part, en fonction de la dose d'irradiation, pour deux hydratations de l'amidon au moment de l'irradiation, d'autre part, en fonction de l'hydratation de l'amidon au moment de l'irradiation, pour une même dose de 25 Mrad.

Les résultats sont discutés par rapport aux travaux poursuivis parallèlement sur ces mêmes produits, concernant l'action du rayonnement gamma vis-à-vis de certaines caractéristiques du grain d'amidon : dispersibilité dans l'alcool à 80°GL et dans l'eau, nombre d'unités glucose modifiées.

On a pu montrer ainsi que l'allure de l'alpha- et de la bêta-amylolyse à l'état cru, après irradiation, dépend surtout :

— d'une part, de l'état de dispersibilité de la partie macromoléculaire et, d'une manière plus générale, de la façon dont les contacts entre l'enzyme et le substrat sont facilités par une modification de la structure du grain d'amidon ;

— d'autre part, de la proportion d'unités anhydroglucose altérées existant dans les macromolécules et qui constituent des points de blocage vis-à-vis de l'action enzymatique.

Mots clés : *Irradiation gamma, amidon, hydratation, amylolyse.*

I. — INTRODUCTION

L'effet de l'irradiation de l'amidon par le rayonnement gamma sur ses caractéristiques a déjà suscité de nombreux travaux dont les résultats ont fait l'objet de plusieurs mises au point (PHILLIPS, 1961 ; REUSCHL, 1962 ; TOLLIER, 1965).

Cependant peu d'études ont encore été consacrées au comportement des amidons

(1) Ce travail relate une partie d'un travail de Thèse d'Ingénieur du Conservatoire national des Arts et Métiers de Paris ; l'étude a été effectuée dans le cadre d'un contrat de recherches (E 9 - 10 - 42, Grant Fg Fr 108) établi entre l'Institut national de la Recherche agronomique et le Département de l'Agriculture des U. S. A. (U. S. D. A.).

irradiés, lorsqu'ils sont soumis à l'action des amylases. La bêta-amylolyse de l'amidon de pomme de terre irradié, puis empesé ou dispersé en milieu alcalin et neutralisé, a été examinée par SAMEC (1962) et NIKUNI (1959). En outre, NISHIMURA a étudié l'action de la bêta-amylase sur l'amylose irradiée et GREENWOOD (1963) a fait une étude similaire sur les fractions amylose et amylopectine isolées d'amidon de pomme de terre soumis aux irradiations gamma.

Aucun travail ne semble avoir porté, jusqu'à présent, sur l'influence de l'irradiation de l'amidon granulaire vis-à-vis de sa sensibilité, à l'état non empesé, aux alpha- et bêta-amylases.

On sait que le grain d'amidon non endommagé n'est pas dégradé par la bêta-amylase ; par contre, sous l'action de l'alpha-amylase bactérienne, il est attaqué de façon très progressive, le phénomène étant beaucoup plus lent avec l'amidon de pomme de terre qu'avec l'amidon de céréales (maïs, blé). LEACH et SCHOCH (1959), SANDSTEDT et SCHROEDER (1960), GUILBOT et MERCIER (1962) ont examiné le processus de cette hydrolyse et l'influence de certains traitements sur son évolution. Dans le but d'améliorer la connaissance des causes de la plus ou moins grande sensibilité des amidons à l'amylolyse et d'essayer de préciser certaines modifications produites par l'irradiation, il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude de l'hydrolyse par l'alpha- et la bêta-amylase des grains d'amidon de pomme de terre et de maïs irradiés par le rayonnement gamma.

II. — MÉTHODES UTILISÉES

Les amidons de maïs et de pomme de terre, convenablement hydratés par sorption ou désorption et répartis en ampoules scellées, sont soumis au rayonnement gamma produit par une source de 1 400 Ci de ^{60}Co débitant 2,3 Krad/minute [1].

La sensibilité, à l'état cru, de ces amidons irradiés, vis-à-vis de l'action de l'alpha-amylase bactérienne, d'une part, et de celle de la bêta-amylase du malt, d'autre part, a été examinée à 37°C, respectivement aux pH 7 et 4,9 dans des conditions de concentrations bien définies, décrites par ailleurs (TOLLIER, 1965). La cinétique de la dégradation a été suivie en dosant à l'anthrone la fraction glucidique libérée au cours de l'hydrolyse enzymatique et solubilisée par l'alcool à 80°GL. Tous les résultats ont été exprimés par rapport à la fraction glucidique macromoléculaire de l'amidon irradié. Cette fraction peut s'exprimer par la différence entre la quantité totale des glucides dosables à l'anthrone (G. t. A.) contenus dans l'amidon natif et la quantité de glucides alcoolosolubles de l'amidon irradié au temps o de l'amylolyse (G. a. i.). En désignant par G. a. T. la quantité de glucides alcoolosolubles de l'amidon irradié au temps T de l'amylolyse, la quantité d'amidon hydrolysé au temps T aura pour valeur :

$$\frac{\text{G. a. T.} - \text{G. a. i.}}{\text{G. t. A.} - \text{G. a. i.}} \times 100.$$

III. — RÉSULTATS OBTENUS

3. 1. — *Alpha-amylolyse des amidons de maïs et de pomme de terre irradiés*

La figure 1 représente, en fonction du temps, les courbes d'alpha-amylolyse de la fraction glucidique macromoléculaire de l'amidon de maïs hydraté à 17 p. 100 et

[1] Nous tenons à remercier M. DUPUY, Directeur de Recherches à l'I. N. R. A., d'avoir bien voulu se charger de l'irradiation des échantillons.

irradié à différentes doses comprises entre 0 et 75 Mrad. La sensibilité à l'alpha-amylase de cet amidon, à l'état cru, augmente avec la dose d'irradiation, et au-delà d'une dose de 35 Mrad, l'hydrolyse de la fraction macromoléculaire est quasi totale après 24 heures. Afin de préciser l'évolution de cette amylolyse en fonction des conditions d'irradiation, nous avons distingué, sur les courbes, une phase initiale d'amylolyse

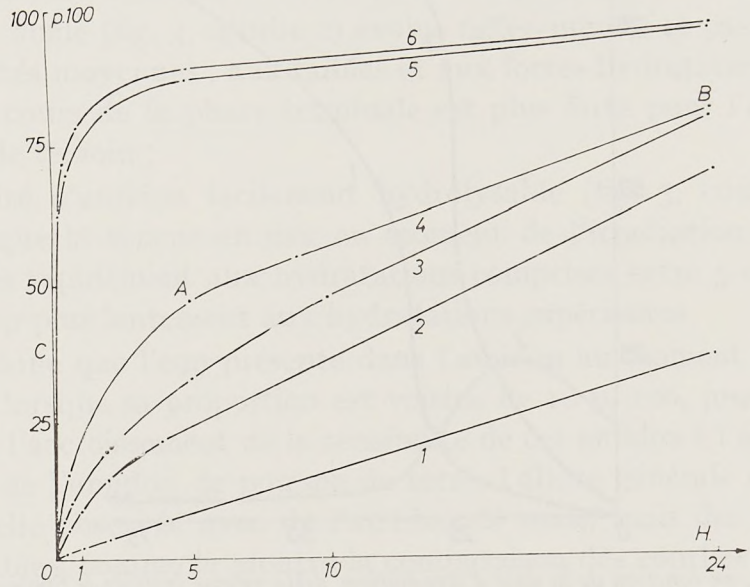


Fig. 1. — *Évolution, en fonction du temps en heures, de l'α-amylolyse à l'état cru de l'amidon de maïs irradié à une hydratation de 17 p. 100 et à différentes doses*

Témoin	: courbe	1
12,5 Mrad	:	2
19 Mrad	:	3
25 Mrad	:	4
35 Mrad	:	5
75 Mrad	:	6

(OA) et une phase terminale (AB). Les vitesses d'hydrolyse au cours de ces phases ont été arbitrairement définies en déterminant, pour la phase initiale, la pente de la tangente à l'origine de la courbe et, pour la phase terminale, la pente de la partie linéaire de la courbe. Nous avons considéré que l'extrapolation en (C) de cette partie linéaire détermine la quantité d'amidon facilement hydrolysable au cours de la première phase. Pour le même amidon irradié, la figure 2 montre, en fonction de la dose d'irradiation, les variations des vitesses initiale et finale d'amylolyse, ainsi que l'évolution de la quantité d'amidon facilement hydrolysable.

On observe que :

— la vitesse initiale d'amylolyse (fig. 2, courbe 1) s'accroît, d'abord lentement, puis très rapidement, en fonction de la dose d'irradiation, la variation rapide se produisant aux doses comprises entre 30 et 37 Mrad ; aux doses supérieures, la vitesse continue à croître, mais plus lentement ;

— la vitesse finale d'amylolyse (fig. 2, courbe 2) passe par un maximum pour une dose comprise entre 12,5 et 20 Mrad ; au-delà d'une dose de 35 Mrad, cette vitesse devient très faible ;

— la proportion de la fraction facilement hydrolysable (fig. 2, courbe 3) augmente rapidement pour des doses comprises entre 12,5 et 25 Mrad ; elle se stabilise ensuite jusqu'à la dose de 75 Mrad.

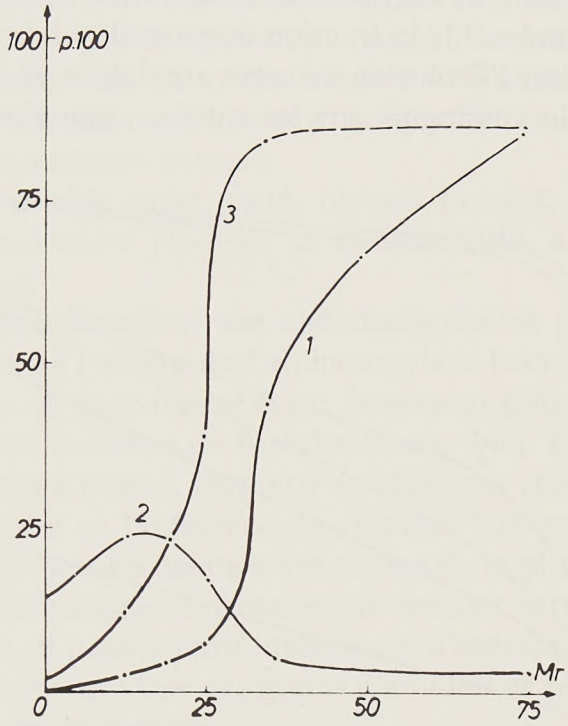


FIG. 2. — *Évolution, en fonction de la dose d'irradiation, de la vitesse initiale et finale d'amylolyse* (courbes 1 et 2) *et de la fraction facilement hydrolysable* (courbe 3) *pour un amidon de maïs irradié à une hydratation de 17 p. 100.*

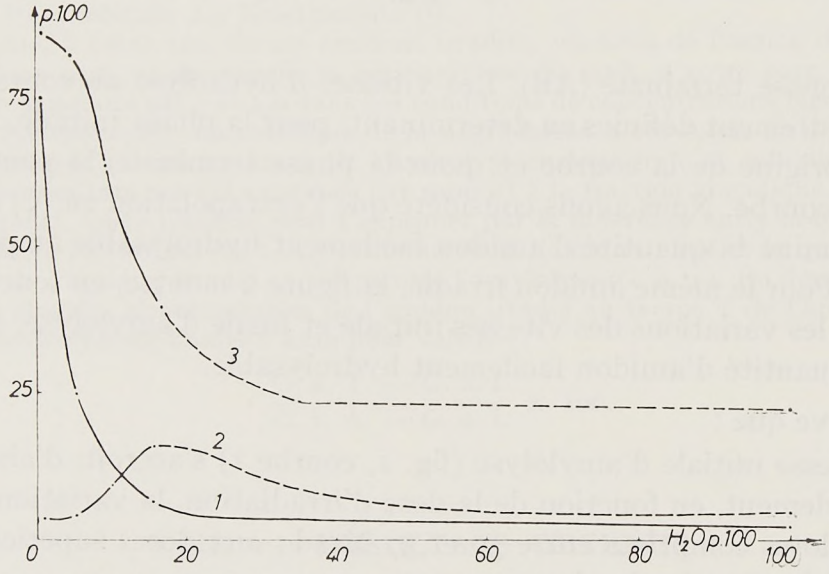


FIG. 3. — *Évolution, en fonction de l'hydratation de l'échantillon au moment de l'irradiation, de la vitesse initiale et finale d'amylolyse et de la fraction facilement hydrolysée de l'amidon de maïs irradié à 25 Mrad.*

Vitesse initiale : courbe 1
Vitesse finale : courbe 2
Fraction facilement hydrolysable : courbe 3

Si l'on examine maintenant l'évolution de ces caractéristiques d'amylolyse dans le cas d'un amidon de maïs irradié à 25 Mrad, en fonction de sa teneur en eau au moment de l'irradiation, on observe les résultats suivants :

— la vitesse initiale (fig. 3, courbe 1), très élevée dans l'amidon irradié peu hydraté, diminue brutalement lorsque l'hydratation augmente jusque vers 9 p. 100, puis beaucoup plus lentement aux hydratations supérieures ;

— la vitesse finale (fig. 3, courbe 2) évolue différemment et passe par un maximum aux humidités moyennes ; aux faibles et aux fortes hydratations, la résistance à l'amylolyse au cours de la phase terminale est plus forte pour l'amidon de maïs irradié que pour le témoin ;

— la quantité d'amidon facilement hydrolysable (fig. 3, courbe 3) diminue lentement, tant que la teneur en eau au moment de l'irradiation ne dépasse pas 5 p. 100, puis très rapidement aux hydratations comprises entre 5 et 11 p. 100 et à nouveau beaucoup plus lentement aux hydratations supérieures.

Il apparaît donc que l'eau présente dans l'amidon au moment de l'irradiation, particulièrement lorsque sa proportion est voisine de 10 p. 100, joue un rôle inhibiteur vis-à-vis de l'accroissement de la sensibilité de cet amidon à l'alpha-amylolyse.

Dans le cas de l'amidon de pomme de terre, l'allure générale des phénomènes est similaire à celle observée avec de l'amidon de maïs, mais des différences sont cependant décelables, comme le montre la comparaison des courbes d'amylolyse des amidons de pomme de terre et de maïs, irradiés avec des teneurs en eau identiques, voisines de 1 p. 100 et de 17 p. 100 :

— *Pour une hydratation inférieure à 1 p. 100 :*

— la vitesse initiale est plus importante dans le cas de l'amidon de pomme de terre (fig. 4 *c*, courbe 1) que dans le cas de l'amidon de maïs (fig. 4 *a*, courbe 1), au moins aux doses inférieures à 25 Mrad ; à partir de cette dose, elle reste pratiquement constante pour l'amidon de pomme de terre, tandis qu'elle décroît pour celui de maïs ;

— la vitesse finale, après avoir atteint son maximum, décroît plus lentement avec l'amidon de pomme de terre (fig. 4 *c*, courbe 2) qu'avec celui de maïs (fig. 4 a, courbe 2) ; pour chacun des amidons elle tend vers un palier, qui est plus élevé avec l'amidon de pomme de terre ;

— la quantité d'amidon facilement hydrolysable augmente plus rapidement pour l'amidon de pomme de terre (fig. 4 *c*, courbe 3) que pour l'amidon de maïs (fig. 4 *a*, courbe 3), tant que la dose d'irradiation ne dépasse pas 25 Mrad ; au-delà de cette dose, elle tend vers une limite dans le cas de l'amidon de pomme de terre, alors qu'elle passe par un maximum pour l'amidon de maïs.

— *Pour une hydratation de 17 p. 100 :*

— la vitesse initiale est sensiblement la même avec les deux amidons (fig. 4 *b* et 4 *d*, courbe 1), tant que la dose d'irradiation ne dépasse pas 35 Mrad ; au-delà de cette dose, elle s'accroît plus vite pour l'amidon de pomme de terre ;

— la vitesse finale s'accroît plus lentement avec l'amidon de pomme de terre (fig. 4 *d*, courbe 2) qu'avec l'amidon de maïs (fig. 4 *b*, courbe 2) ; elle passe par un maximum pour des doses respectives d'irradiation de 50 et de 19 Mrad ;

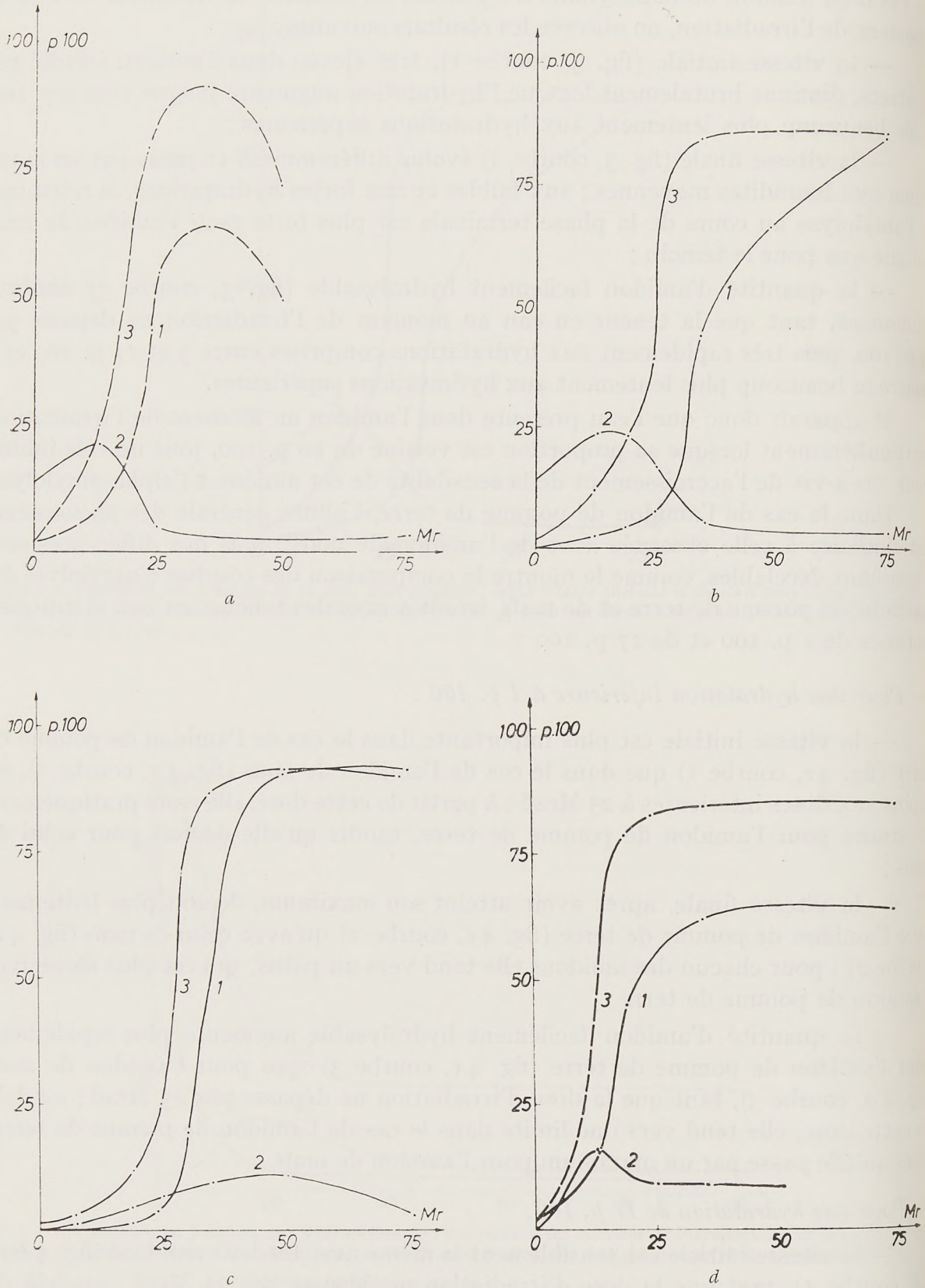


FIG. 4. — *Évolution, en fonction de la dose d'irradiation, de la vitesse initiale* (1) *et finale* (2) *d'amylolyse et de la fraction facilement hydrolysable de l'amidon* (3).

a) Amidon de maïs irradié à une hydratation < 1 p. 100
b) Amidon de maïs irradié à une hydratation de 17 p. 100
c) Amidon de pomme de terre irradié à une hydratation < 1 p. 100
d) Amidon de pomme de terre irradié à une hydratation de 17 p. 100

— la quantité d'amidon facilement hydrolysable augmente d'abord plus lentement pour l'amidon de pomme de terre (fig. 4 *d*, courbe 3) que pour l'amidon de maïs (fig. 4 *b*, courbe 3), tant que la dose ne dépasse pas 30 Mrad ; elle devient un peu plus importante pour l'amidon de pomme de terre à partir de cette dose ; au-delà, la différence demeure sensiblement constante.

Il existe donc des différences non négligeables entre les sensibilités à l'action de l'alpha-amylase des amidons de pomme de terre et de maïs irradiés.

3. 2. — *Bêta-amylolyse des amidons de maïs et de pomme de terre irradiés*

Indiquons tout d'abord que l'action hydrolytique de la bêta-amylase est toujours sensiblement plus faible avec un amidon irradié qu'avec un amidon natif, lorsque ces amidons ont subi un empesage avant amylolyse.

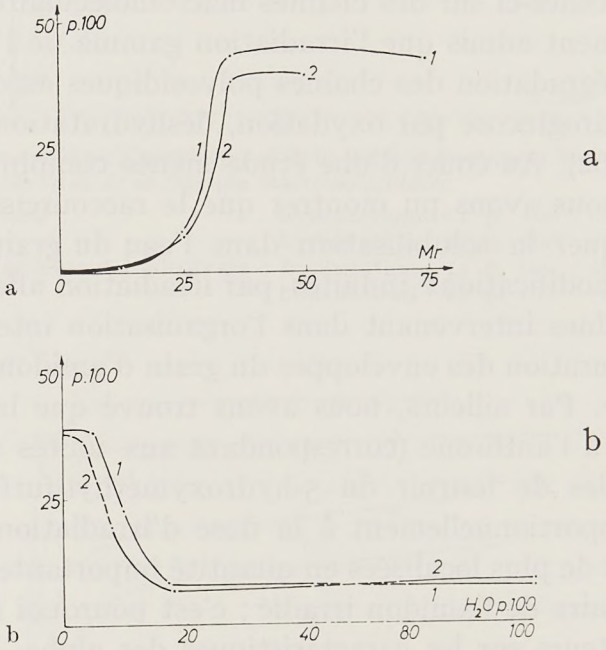


Fig. 5 *a*. — *Évolution, en fonction de la dose d'irradiation, du pourcentage de fraction macromoléculaire hydrolysée par la β-amylase, pour des amidons irradiés à une hydratation 17 p. 100.*

Fig. 5 *b*. — *Évolution, en fonction de l'hydratation de l'échantillon au moment de l'irradiation, du pourcentage de fraction moléculaire hydrolysée par la β-amylase, pour des amidons irradiés à 25 Mrad.*

Amidon de maïs à l'état cru : courbe 1
Amidon de pomme de terre à l'état cru : courbe 2

La figure 5 *a* représente, en fonction de la dose d'irradiation, la quantité hydrolysée en 5 heures par la bêta-amylase des amidons de pomme de terre et de maïs hydratés à 17 p. 100 et irradiés. On constate que la quantité hydrolysée augmente d'abord lentement avec la dose d'irradiation jusqu'à une dose de 25 Mrad, puis rapidement aux doses comprises entre 25 et 35 Mrad pour ne plus varier sensiblement ensuite. De plus, cette quantité est plus importante pour l'amidon de maïs que pour l'amidon de pomme de terre, tout au moins pour les doses comprises entre 25 et 50 Mrad.

La figure 5 *b* représente, en fonction de la teneur en eau de l'échantillon au moment de l'irradiation, l'évolution de la quantité hydrolysée par la bêta-amylase, pour les amidons de maïs et de pomme de terre irradiés à la dose de 25 Mrad. On observe que l'eau joue un rôle inhibiteur de l'action du rayonnement particulièrement important pour les hydratations comprises entre 5 et 18 p. 100 ; l'effet inhibiteur est sensiblement le même pour les deux amidons considérés.

IV. — DISCUSSION ET INTERPRÉTATION

Dans la discussion qui va suivre, nous allons tenter de relier les phénomènes observés avec certaines transformations des caractéristiques physico-chimiques du grain d'amidon et de ses constituants, consécutives à cette irradiation. Nous considérerons plus particulièrement celles susceptibles, d'une part, d'augmenter l'accessibilité des macromolécules glucidiques aux enzymes, d'autre part, de freiner ou de bloquer l'action de celles-ci sur des chaînes macromoléculaires.

Il est généralement admis que l'irradiation gamma de l'amidon conduit essentiellement à une dégradation des chaînes polyosidiques accompagnée de modifications d'unités anhydroglucose par oxydation, déshydratation ou rupture de liaison C—C (Reuschl, 1962). Au cours d'une étude menée conjointement à celle que nous venons d'exposer, nous avons pu montrer que le raccourcissement des chaînes ne suffit pas à provoquer la solubilisation dans l'eau du grain d'amidon. C'est dans la mesure où les modifications induites par irradiation affaiblissent suffisamment les liaisons interchaînes intervenant dans l'organisation intermacromoléculaire, ou aboutissant à la fissuration des enveloppes du grain d'amidon, que la solubilité dans l'eau est augmentée. Par ailleurs, nous avons trouvé que la fraction de l'amidon irradié non dosable à l'anthrone (correspondant aux unités anhydroglucose qui ne sont plus susceptibles de fournir du 5-hydroxyméthyl-furfural sous l'action des acides) s'accroît proportionnellement à la dose d'irradiation. Ces unités anhydroglucose altérées sont de plus localisées en quantité importante dans la fraction glucidique macromoléculaire de l'amidon irradié ; c'est pourquoi nous examinerons l'influence de deux facteurs sur les caractéristiques des alpha- et bêta-amylolyses des amidons irradiés : d'une part, la solubilité dans l'eau de leur fraction macromoléculaire, d'autre part, la présence des unités anhydroglucose modifiées.

4. 1. — *Cas de l'alpha-amylolyse*

Pour l'amidon de maïs hydraté à 17 p. 100 et irradié, la vitesse initiale d'amylolyse croît à peu près linéairement en fonction de la proportion de fraction glucidique macromoléculaire soluble dans l'eau (fig. 6, courbe 2). La solubilité joue un rôle prédominant sur la variation de vitesse initiale.

Lorsque cet amidon est soumis à l'irradiation à une hydratation inférieure à 1 p. 100, la vitesse initiale s'accroît de la même façon tant que la proportion de la fraction soluble reste inférieure à 35 p. 100. Au-delà de cette proportion, la vitesse initiale d'amylolyse s'accroît encore, mais beaucoup plus lentement, et finit même par décroître lorsque la solubilisation est quasi totale (fig. 6, courbe 1). Dans ce cas

particulier de l'irradiation d'un amidon à peu près sec, tout se passe comme si certaines altérations produites par les doses donnant 35 p. 100 de solubilité (35 Mrad) freinaient l'amylolyse. Nous ne pouvons pas actuellement préciser s'il s'agit d'une concentration plus importante d'unités anhydroglucose modifiées, dans les chaînes de la fraction glucidique macromoléculaire, ou d'un autre effet inhibiteur.

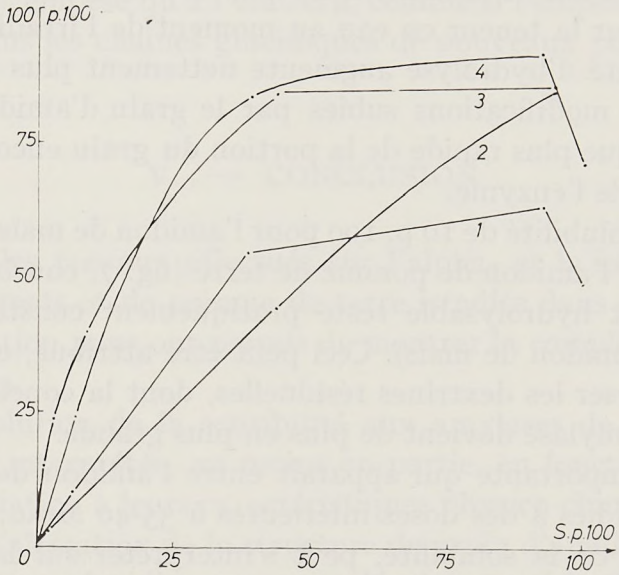


Fig. 6. — *Évolution de la vitesse initiale d'amylolyse et de la fraction facilement hydrolysée de l'amidon de maïs irradié, en fonction de la solubilité de sa fraction macromoléculaire.*

Vitesse initiale : hydratation <1 p. 100 : courbe 1
hydratation 17 p. 100 : courbe 2
Fraction facilement hydrolysée : hydratation <1 p. 100 : courbe 3
hydratation 17 p. 100 : courbe 4

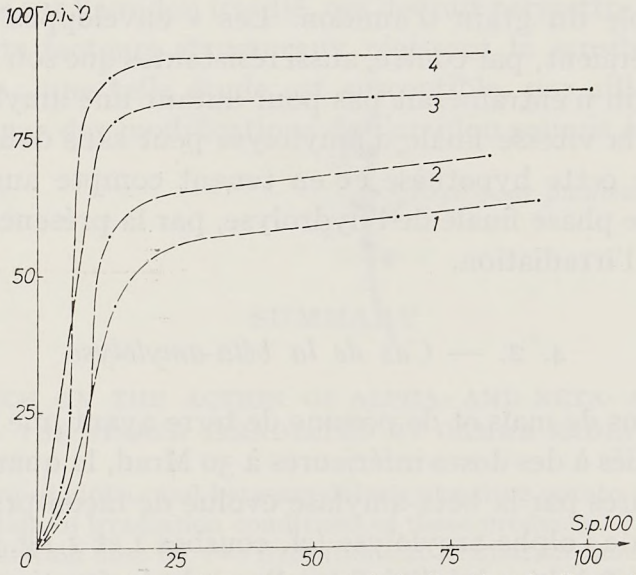


Fig. 7. — *Évolution de la vitesse initiale d'amylolyse et de la fraction facilement hydrolysée de l'amidon de pomme de terre irradié, en fonction de la solubilité de sa fraction macromoléculaire.*

Vitesse initiale : hydratation <1 p. 100 : courbe 1
hydratation 17 p. 100 : courbe 2
Fraction facilement hydrolysée : hydratation <1 p. 100 : courbe 3
hydratation 17 p. 100 : courbe 4

Dans le cas de l'amidon de pomme de terre irradié, la vitesse initiale d'amylolyse, aussi bien pour l'amidon irradié sec (fig. 7, courbe 1) que pour l'amidon irradié à 17 p. 100 (fig. 7, courbe 2), s'accroît d'abord beaucoup plus rapidement que pour

l'amidon de maïs. Puis, lorsque le taux de solubilité atteint 15 p. 100, l'accroissement ne se fait plus que très lentement et de façon comparable aux deux hydratations. On observe à nouveau le freinage de l'amylolyse constaté avec l'amidon de maïs très sec.

Si l'on considère l'évolution de la fraction facilement hydrolysable, en fonction de la solubilité dans l'eau de la fraction macromoléculaire, on observe que son allure est peu influencée par la teneur en eau au moment de l'irradiation (fig. 7, courbes 3 et 4) et que la facilité d'hydrolyse augmente nettement plus vite que la solubilité. Il apparaît que les modifications subies par le grain d'amidon irradié permettent également une attaque plus rapide de la portion du grain encore insoluble, en facilitant la pénétration de l'enzyme.

Au-delà d'une solubilité de 10 p. 100 pour l'amidon de maïs (fig. 6, courbes 3 et 4) et de 15 p. 100 pour l'amidon de pomme de terre (fig. 7, courbes 3 et 4), la quantité d'amidon facilement hydrolysable reste pratiquement constante ; elle peut même diminuer (cas de l'amidon de maïs). Ceci peut être attribué, en partie, à la difficulté croissante d'hydrolyser les dextrines résiduelles, dont la concentration en points de blocage de l'alpha-amylase devient de plus en plus grande.

La différence importante qui apparaît entre l'amidon de maïs et l'amidon de pomme de terre irradiés à des doses inférieures à 35-40 Mrad, dans la facilité d'hydrolyse en fonction de la solubilité, peut s'interpréter sur la base de l'hypothèse émise par GUILBOT et MERCIER (1962) concernant les « enveloppes » externe et internes des grains d'amidon.

Selon ces auteurs, les grains d'amidon de pomme de terre posséderaient une « enveloppe » externe beaucoup plus résistante que les « enveloppes » internes ; la destruction de cette « enveloppe » externe permettrait à l'alpha-amylase bactérienne d'attaquer l'ensemble du grain d'amidon. Les « enveloppes » internes du grain d'amidon de maïs seraient, par contre, aussi résistantes que son « enveloppe » externe et une lésion du grain n'entraînerait pas pour autant une amylolyse aussi rapide.

L'évolution de la vitesse finale d'amylolyse peut sans doute également s'expliquer sur la base de cette hypothèse et en tenant compte aussi du ralentissement provoqué, dans cette phase finale de l'hydrolyse, par la présence des unités anhydroglucose altérées par l'irradiation.

4. 2. — *Cas de la bêta-amylolyse*

Pour les amidons de maïs et de pomme de terre ayant une teneur en eau voisine de 17 p. 100 et irradiés à des doses inférieures à 30 Mrad, la quantité d'amidon irradié hydrolysée en 5 heures par la bêta-amylase évolue de façon pratiquement identique à la vitesse initiale de l'alpha-amylolyse (cf. courbes 1 et 2 fig. 5 *a* et courbe 1 fig. 4 *b* et 4 *d*). Relativement à la solubilité dans l'eau de la fraction macromoléculaire de l'amidon, les déductions faites pour cette caractéristique de l'alpha-amylolyse sont donc également applicables à la bêta-amylolyse.

Pour des doses d'irradiation comprises entre 35 et 50 Mrad, la quantité d'amidon irradié hydrolysée par la bêta-amylase atteint sensiblement un maximum qui traduirait la résultante de deux phénomènes jouant en sens inverse : la formation d'unités anhydroglucose altérées et la solubilisation plus complète des composants de l'amidon. Au-delà d'une dose de 50 Mrad, la solubilisation étant pratiquement totale, seule

l'influence inhibitrice de l'accroissement des unités anhydroglucose altérées se manifeste légèrement.

Il convient de noter que cette limite de bêta-amylolyse à l'état cru est toujours inférieure à celle obtenue avec l'amidon empesé non irradié. Par contre, aux fortes doses, lorsque l'amidon se dissout en quasi-totalité dans l'eau, le seuil de l'amylolyse est plus faible à l'état empesé qu'à l'état cru, comme si l'empesage de l'amidon ainsi irradié produisait dans les chaînes glucidiques de nouveaux points de blocage de la bêta-amylolyse.

V. — CONCLUSION

En conclusion, les travaux effectués sur l'alpha- et la bêta-amylolyse à l'état cru des amidons de maïs et de pomme de terre irradiés dans différentes conditions de dose et d'hydratation nous ont permis de montrer la complexité des phénomènes globalement observés.

Cependant l'évolution de la sensibilité aux amylases de ces amidons irradiés semble pouvoir être interprétée, au moins en partie, en fonction des modifications apportées par l'irradiation à leurs caractéristiques physico-chimiques :

— d'une part, l'altération de la structure du grain d'amidon et la solubilisation dans l'eau de la fraction glucidique macromoléculaire, qui facilitent le contact entre l'enzyme et le substrat ;

— d'autre part, la présence dans les macromolécules d'unités anhydroglucose altérées, qui peuvent constituer des points de blocage de l'action enzymatique.

Ces premiers résultats permettent de mettre en évidence l'intérêt de l'étude de l'action des enzymes sur l'amidon irradié, qui devrait permettre de mieux comprendre le rôle des différents facteurs structuraux régissant la sensibilité aux enzymes de l'amidon granulaire ; une telle étude est susceptible, par ailleurs, d'aboutir à une meilleure connaissance des modifications de l'amidon soumis à l'irradiation gamma.

Reçu pour publication en février 1971.

SUMMARY

RESEARCH ON THE ACTION OF ALPHA- AND BETA- AMYLASES ON THE STARCH IRRADIATED BY GAMMA RADIATION.

The action pattern of alpha- and beta-amylolysis of native potato and corn starch has been investigated as a function of irradiation conditions of these products.

The effect of irradiation dose for two hydrations at irradiation time has been studied as well as the role of starch hydratation while irradiated, for the same dose of 25 Mrad.

The results are discussed and related to other investigations made on the same products, concerning the action of gamma-irradiation in some characteristics of the starch granule as dispersibility in alcohol 80°GL, and in water and the number of modified glucose units.

It is shown that the action pattern of the alpha and beta-amylolysis at the native state after irradiation depends above all on :

— the dispersibility state of the macromolecular part and more generally on the modification of the structure of the starch granule, which facilitates the contact between the enzyme and the substrate ;

— the proportion of modified anhydroglucose units in the macromolecule, which blocks the enzyme action.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA ACCION DE LAS AMILASAS ALPHA Y BETA SOBRE EL ALMIDÓN IRRADIADO POR MEDIO DE RADIACIONES GAMMA

La evolución del comportamiento de los alpha y beta-amilolisis, en estado crudo, del almidón de la patata y del almidón del maíz, ha sido seguida en función de las condiciones de irradiación de estos productos.

El estudio ha sido llevado a cabo, en primer lugar, en función de la dosis de radiación, para dos hidrataciones del almidón en el momento de la irradiación, y, en segundo lugar, en función de la hidratación del almidón en el momento de la irradiación, para una misma dosis de 25 Mrad.

Los resultados son puestos en discusión en relación con los trabajos proseguidos paralelamente sobre estos mismos productos, respecto a la acción de la radiación gamma en relación con ciertas características del grano del almidón : dipersabilidad en el alcohol a 80°GL y en el agua, número de unidades de glucosa modificadas.

Se ha llegado a poder demostrar así que el comportamiento del alpha y del beta-amilosis en estado crudo, previa irradiación, depende sobre todo :

— en primer lugar, del estado de dispersabilidad de la parte macromolecular y, más generalmente, de la forma en que los contactos entre la enzima y el substrato quedan facilitados por una modificación de la estructura del grano de almidón ;

— en segundo lugar, de la proporción de unidades anhidroglucosa alteradas existentes en las macromoléculas y que constituyen otros tantos puntos de bloqueo en relación con la acción enzimática.

RIASSUNTO

STUDIO DELL'AZIONE DELLE AMILASI ALPHA E BETA SULL'AMIDO IRRADIATO MEDIANTE IRRADIAZIONE GAMMA

L'evoluzione dell'andamento delle alpha e beta-amilolisi, allo stato crudo, dell'amido della patata e del granoturco è stata studiata in funzione delle condizioni d'irradiazione di questi prodotti.

Lo studio è stato fatto, da una parte, in funzione della dose di radiazione, per due idratazioni dell'amido al momento dell'irradiazione, d'altra parte in funzione dell'idratazione dell'amido al momento dell'irradiazione, per una stessa dose di 25 Mrad.

I risultati sono discussi in rapporto ai lavori proseguiti parallelamente su questi stessi prodotti e che concernono l'azione dell'irradiamento gamma nei confronti di alcune caratteristiche del grano d'amido : dispersività nell'alcool a 80°GL e nell'acqua, numero di unità di glucosio modificate.

Si è potuto cosi' dimostrare che l'andamento dell'alpha e della beta-amilolisi allo stato crudo, dopo irradiazione, dipende soprattutto :

— da una parte, dallo stato di dispersività della parte macromolecolare e in modo più generale, dal modo in cui i contatti tra l'enzima e il sottostrato sono facilitati da una modifica della struttura del grano d'amido ;

— d'altra parte, dalla proporzione d'unità anidroglucosico alterate che esistono nelle macromolecole e che costituiscono dei punti di bloccaggio nei confronti dell'azione enzimatica.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GREENWOOD C. T., 1963. The irradiation of starch. Part 1. The properties of potato starch and its components after irradiation with high-energy-electrons. *Die Stärke*, **15** (12), 444-448.

GUILBOT A., MERCIER Ch., 1962. Répercussions sur la digestibilité de l'amidon des modifications de sa structure physico-chimique au cours de ses transformations technologiques. *Industr. aliment. agric.*, (11), 939-947.

LEACH H. W., SCHOCH T. J., 1961. Structure of the starch granule II. — Action of various amylases on granular starch. *Cereal Chem.*, **38** (1), 34-36.

NIKUNI Z., MISHINA A., 1959. Modifications des propriétés de l'amidon de pomme de terre par l'irradiation gamma. *J. agric. chem. Soc. Jap.*, **33**, 931-936.

NISHIMURA A., TAKAOKA K. Gamma radiation induced change in susceptibility of amylose with amylases. *4e Conférence de Radioisotopes au Japon* (sans lieu ni date).

PHILLIPS G. O., 1961. Radiation chemistry of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **16**, 13-58.

REUSCHL H., 1962. *Contribution à l'étude des radiations ionisantes sur l'amidon: effets des radiations gamma sur l'amidon de pomme de terre en fonction de sa teneur en eau.* Thèse d'Université, Paris.

SAMEC M., 1962. Modifications de l'amidon sous l'influence de l'énergie rayonnante. *Industr. aliment. agric.*, (12), 1073-1082.

SANDSTEDT R. M., SCHROEDER H., 1960. A photomicrographic study of mechanically damaged wheat starch. *Food Technol.*, **14**, 257-265.

TOLLIER M. Th., 1965. *Contribution à l'étude de l'action du rayonnement gamma sur les caractères physico-chimiques de l'amidon et sa sensibilité aux amylases.* Thèse d'Ingénieur du Conservatoire national des Arts et Métiers (Paris).

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 75-87.

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN ŒUFS DES PÂTES ALIMENTAIRES

I. — Par analyse de la fraction lipidique. Dosage des lipides, de la choline et des acides gras

K. KOBREHEL [1]

Laboratoire de Chimie biologique,
Faculté des Sciences, 34 - Montpellier

RÉSUMÉ

Différents procédés de détermination de la teneur en œufs des pâtes alimentaires par analyse de la fraction lipidique sont étudiés.

Les résultats fournis par les dosages des lipides, de la choline et des acides gras ont été comparés. La détermination des lipides totaux par la méthode azéotropique donne les résultats les plus reproductibles, mais doit être complétée par l'analyse des acides gras constitutifs de manière à déceler plus sûrement les fraudes éventuelles.

Le dosage de la choline totale ou lipidique est à écarter.

Mots clés : *Œufs, pâtes alimentaires, blés durs, lipides, choline, acides gras.*

INTRODUCTION

Suivant la législation française, les produits dénommés « pâtes alimentaires aux œufs » ont une teneur minimale de 140 g d'œufs entiers (coques exclues) ou de jaunes par kilogramme de semoule, ou le poids correspondant de poudre d'œufs entiers ou de jaunes. Les « pâtes alimentaires aux œufs frais » doivent contenir des œufs frais dans les mêmes proportions.

La recherche de méthodes de dosage des œufs dans les pâtes correspond donc au double besoin de contrôler la qualité des produits au cours de la fabrication et de déceler les fraudes éventuelles. Les méthodes proposées, dont aucune n'est exempte

[1] Actuellement au Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz, I. N. R. A., Centre de Recherches de Montpellier.

de critique, peuvent se diviser en deux groupes : celles qui reposent sur le dosage ou la caractérisation des constituants lipidiques du jaune d'œuf et dont l'étude fait l'objet de cet article ; celles basées sur l'étude des protéines du blanc d'œuf et auxquelles nous consacrerons un prochain mémoire.

Parmi les méthodes qui reposent sur le dosage de certains constituants lipidiques, celle qui consiste à doser le *cholestérol* est certainement la mieux connue et la plus utilisée (HADORN et JUNGKUNZ, 1951 ; PELAGATTI, 1966 ; CHIOFFI, 1966 ; MUNTONI *et al.*, 1966 ; LASKOWSKI et BOLIBOK, 1967 et 1968 ; EECKHAUT, 1968 ; ROBERTS, 1968). Cependant la variation sensible de la richesse des œufs en cholestérol (CALET 1958 ; EDWARDS *et al.*, 1960 ; STAUFER 1967) diminue fortement sa portée.

Le dosage des *phosphatides*, également utilisé, est généralement déconseillé en raison de la dégradation rapide de ces constituants (HADORN et JUNGKUNZ, 1952, 1953 *a*, 1953 *b* ; EECKHAUT, 1968).

Le dosage des *lipides totaux* décrit par HADORN et JUNGKUNZ (1952) n'a donné que des résultats médiocres (ALLIOT, 1958 ; CUSTOT et LASNE, 1960) ; c'est pourquoi nous avons essayé d'introduire la méthode d'extraction azéotropique dont le rendement et la reproductibilité sont supérieurs (KAHANE et REGORD, 1964 ; RECH, 1968). Le dosage de la *choline* a été conseillé pour le contrôle de certains produits (CASSON et GRIFFIN, 1959 ; DAVIDSON et LONG, 1958 ; DAUBNEY et SEXTON, 1950) mais n'a pas donné de résultats satisfaisants dans le cas des pâtes alimentaires. Nous avons alors pensé qu'il serait intéressant de reprendre cette méthode, mais en utilisant de nouvelles techniques de dosage.

De même, nous avons voulu approfondir les méthodes s'appuyant sur le dosage des *acides gras* (SPITERI *et al.*, 1963 ; ARMANDOLA, 1963 *a* et *b* ; ARMANDOLA et BARBERO, 1965), celles-ci ayant été jusqu'à maintenant insuffisamment étudiées en dépit des possibilités qu'elles semblent offrir.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Caractéristiques des échantillons étudiés*

Semoules.

Semoules fabriquées au laboratoire [1] (MATVEEF, 1969) à partir de variétés de Blés durs (*Triticum durum*) cultivées en France : *Lakota* (provenant de trois régions différentes), *Montferrier, Bidi 17, Mandon, Agathé* et une semoule du commerce.

Œufs.

Œufs du commerce de provenances différentes : Œufs *a, b, c, d, e.*

Pâtes aux œufs.

Pâtes aux œufs fabriquées au laboratoire à partir de la semoule du commerce et des œufs *a*. Après passage dans un homogénéiseur, les œufs sont dilués dans des proportions telles que pour une hydratation satisfaisante à l'empâtage (30 ml d'eau pour 100 g de semoule) la teneur en œuf varie de 0 à 200 g par kg de semoule. Après pétrissage, les pâtes sont laminées, coupées et laissées sécher à l'air libre. Il n'a pas semblé utile de sécher les pâtes à des températures comparables à celles généralement utilisées dans l'industrie en raison des traitements thermiques auxquels sont soumis les produits en cours d'analyse (extraction des lipides).

[1] Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz. Centre de Recherches de Montpellier, I.N.R.A.

On notera que, conformément aux habitudes commerciales, on appelle « teneur en œuf » la quantité d'œuf frais, en grammes, ajoutée à 1 000 g de semoules.

2. — *Prise de l'échantillon*

Dans le cas de la semoule, elle est faite directement sans échantillonnage particulier et dans le cas de l'œuf, sur un mélange homogénéisé de cinq œufs ; dans le cas des pâtes aux œufs, sur la poudre obtenue par broyage de manière à ce que 90 p. 100 environ des particules traversent un tamis de 0,31 mm d'ouverture, sous agitation manuelle de 5 minutes.

3. — *Dosage des lipides totaux*

Les lipides sont extraits par la méthode azéotropique (Kahane et Regord, 1964 ; Rech, 1968) ; les prises d'essai d'environ 2 g sont réhydratées avec 10 ml d'eau pendant 30 minutes ; 50 ml d'éthanol à 95 p. 100 (v/v) et 200 ml de benzène y sont ajoutés. L'ensemble est porté à l'ébullition dans un dispositif spécial inspiré de l'appareil classique pour le dosage de l'eau par entraînement au benzène ou au toluène bouillants. Après élimination complète de l'eau, la phase alcool-benzène est décantée puis filtrée. Après une nouvelle extraction identique du résidu, les deux phases organiques sont rassemblées et évaporées sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. Les extraits ainsi obtenus sont purifiés selon la méthode de Folch (Kahane et Regord, 1964), puis pesés après évaporation du solvant. Ces déterminations sont faites en double.

4. — *Dosage de la choline*

On a utilisé les trois méthodes qui semblaient les mieux adaptées à notre problème. On a dosé :

1. la choline libérée par la lécithinase D à partir des lipides extraits par la méthode azéotropique ;
2. la choline lipidique totale ;
3. la choline totale des produits (semoules, œufs, pâtes aux œufs).

La lécithinase D est extraite à partir du chou (Kates, 1954 et 1955 ; Casson et Griffin, 1959 ; Davidson et Long, 1958).

En milieu tamponné (pH = 5,6) en présence de Ca^{++} et d'éther sulfurique, la liaison entre la choline et le phosphodiglycéride se coupe sous l'action de la lécithinase D. On bloque cette réaction par l'acide trichloroacétique.

En raison de la libération lente de la choline, la réaction est arrêtée au bout d'exactement une heure, sans attendre la fin de l'hydrolyse enzymatique, mais en opérant chaque fois rigoureusement dans les mêmes conditions (Davidson et Long, 1958 ; Casson et Griffin, 1959).

La choline lipidique totale et la choline totale des semoules, des œufs et des pâtes aux œufs sont libérées par attaque à l'acide nitrique (Kahane et Regord, 1964).

La prise d'essai est d'environ 100 mg de lipides pour les deux premiers dosages et de 1 à 2 g de produit pour le troisième.

La choline libérée est dosée par la méthode de Kahane et Regord. Précipitée en milieu alcalin par le sel de Reinecke et séparée par filtration, elle est redissoute par l'eau bouillante, puis reprécipitée à l'état de periodure. Ce dernier précipité dissous dans l'alcool est titré au thiosulfate.

Les résultats sont exprimés en ion cholinium $[^{+}N(CH_3)_3CH_2—CH_2OH]$.

5. — *Dosage des acides gras*

Les acides gras des lipides totaux, extraits par la méthode azéotropique, sont directement transformés en esters méthyliques par le méthanol en présence de trifluorure de bore (Morrison et Smith, 1964) puis caractérisés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

— chromatographe Carlo-Erba à détection par ionisation de flamme ;

— colonne en acier inoxydable de 800 mm de longueur et de 5 mm de diamètre remplie de DEGS (succinate de diéthylène glycol) à 20 p. 100 sur chromosorb W lavé à l'acide. Température de la colonne : 190°C ; de la chambre d'injection : 250°C ;

— gaz vecteur : azote « U » avec un débit de 20 ml/mn ;

— gaz combustible : hydrogène ; pression d'entrée 0,4 kg/cm² ;

— gaz comburant : air comprimé ; pression d'entrée 0,9 kg/cm².

Les acides gras sont identifiés par comparaison avec des produits témoins (acides palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique et linolénique).

Leur concentration est déterminée en calculant la surface des pics par triangulation.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. — *Dosage des lipides totaux*

a) *Principe.*

Les lipides des pâtes sont dosés par la méthode azéotropique (KAHANE, 1963). La différence de teneur en lipides des semoules et des œufs permet de calculer la teneur en œuf des pâtes.

b) *Résultats.*

Les résultats obtenus pour des pâtes de teneurs en œuf croissantes sont donnés dans le tableau 1.

TABLEAU I

Détermination de la teneur en œuf dans diverses pâtes aux œufs par dosage des lipides totaux extraits par la méthode azéotropique

	Teneur en lipides (mg/g de matière sèche)	Teneurs en œufs (g/kg de semoule)		
		Réelles	Calculées	
			Formule 1 (2)	Formule 2 (2)
Semoule S_a	17,8			
Œufs *a*	482			
Pâtes aux œufs (1)	22,3	40	37	31
	26,9	80	77	70
	32,4	120	124	116
	34,5	140	142	135
	37,2	160	163	158
	41,5	200	205	199

(1) Fabriquées à partir de la semoule S_a et des œufs *a*.
(2) Voir le texte.

La teneur en œufs portée dans la troisième colonne a été calculée à l'aide de la formule de HADORN et JUNGKUNZ (1952) :

$$T = \frac{3\,800\,(L_p - L_s)}{L_{\alpha} - L_p} \qquad (1)$$

T = teneur en œuf de la pâte aux œufs exprimée en g d'œuf frais par kg de semoule.

L_p = lipides totaux de la pâte aux œufs (mg/g de MS).

L_s = lipides totaux de la semoule commerciale (mg/g de MS).
$L_{œ}$ = lipides totaux des œufs *a* (mg/g de MS).
3 800 = constante de transformation donnant les résultats en œuf frais (1 g d'œuf frais contient en moyenne 0,263 g de matière sèche ; 1/0,263=3,8)

Compte tenu des nombreuses déterminations que nous avons effectuées, les teneurs moyennes en lipides des semoules et des œufs, extraits par la méthode azéotropique, sont respectivement 18,5 et 488 mg par gramme de matière sèche.

En utilisant ces données, la formule (1) devient :

$$T = \frac{3\,800\,(L_p - 18{,}5)}{488 - L_p} \qquad (2)$$

C'est à l'aide de cette formule générale qu'ont été obtenus les résultats de la quatrième colonne.

c) *Discussion.*

Les résultats du tableau 1 confirment la possibilité de déterminer la teneur en œuf des pâtes par le dosage des lipides totaux extraits par la méthode azéotropique. La précision des résultats, qui est de l'ordre de ± 10 g d'œuf frais par kg de pâtes, s'avère alors nettement supérieure à celle obtenue par les autres méthodes proposées (Hadorn et Jungkunz, 1952 ; Alliot, 1958).

La méconnaissance des caractéristiques exactes des matières premières utilisées rendant le plus souvent inapplicable la formule (1), il était nécessaire de s'assurer de la validité de la formule (2), et donc des coefficients 18,5 et 488.

Nous avons vérifié que les facteurs agronomiques et génétiques ne modifiaient que très légèrement la teneur en lipides des semoules ; c'est ainsi que nous avons trouvé 19,2-19,1 et 18,7 mg de lipides par g de matière sèche de semoule pour la même variété *Lakota* récoltée dans trois régions différentes et respectivement 18,3-18,7-18,1 et 17,0 mg de lipides par g de matière sèche pour les variétés *Bidi 17*, *Mandon*, *Montferrier* et *Agathé* cultivées dans les mêmes conditions. Le facteur de variation le plus important pourrait être la pureté de la semoule (élimination plus ou moins complète des enveloppes, des gruaux ou du germe) ; il semble cependant possible de ne pas en tenir compte, les semoules généralement utilisées étant de pureté comparable.

En dépit de l'efficacité remarquable de la méthode azéotropique (pour les produits céréaliers), la teneur moyenne en lipides que nous avons obtenue (18,5 mg / g MS) n'est que très légèrement supérieure à celles calculées par Hadorn et Jungkunz (1952) ou par Custot et Lasne (1960) (respectivement 17 et 18). En réalité, cette concordance n'est qu'apparente. Contrairement aux résultats donnés par les autres auteurs, nos valeurs concernent en effet la teneur en lipides purifiés ; avant purification, notre moyenne s'établissait aux environs de 21,5 mg p. 100 g MS. La moins bonne reproductibilité des méthodes précédemment proposées tient, probablement pour une grande part, au manque de rigueur dans le dosage des lipides totaux et notamment à l'absence de purification dont Kahane et Regord (1964) ont souligné toute l'importance.

En ce qui concerne les œufs, les différences absolues de teneurs en lipides entre plusieurs échantillons sont plus importantes (teneur minimale : 470 mg/g MS ; teneur maximale : 512 mg/g MS) mais les écarts relatifs sont sensiblement du même

ordre ; la valeur moyenne trouvée (488 mg/g MS), est comparable à celle déterminée par HADORN et JUNGKUNZ (1952), soit 483 mg/g MS, et utilisée ensuite par d'autres auteurs (ALLIOT, 1958 ; CUSTOT et LASNE, 1960 ; LECOQ, 1965).

En gardant à l'esprit que les résultats seront entachés d'une erreur de l'ordre de ± 10 g d'œufs frais, l'utilisation de la formule (2) semble donc pouvoir être recommandée, mais à la condition d'extraire les lipides par la méthode azéotropique.

2. — *Dosage de la choline*

a) *Principe.*

On dose la teneur en choline des pâtes aux œufs. La teneur en œuf de la pâte peut être ensuite déterminée, en adaptant la formule utilisée au paragraphe précédent.

b) *Résultats.*

Nous avons regroupé l'ensemble des résultats dans le tableau 2, ci-dessous.

TABLEAU 2

Teneur en choline des semoules, des œufs, des pâtes, et des lipides qui en sont extraits

	Choline totale (valeurs extrêmes et moyennes) mg par g M.S.	Choline lipidique mg par g de lipides	
		Totale	Libérée après une heure par la lécithinase D
Semoules	1,36 à 1,68 1,45	49,2	3,0 à 4,3
Œufs	13,7 à 17,9 15,3	26,0	4,2 à 5,3
Pâte à 150 g d'œuf	2,24	41,6	3,2
Teneur en œuf calculée [1] (g/kg de semoule)	230	138	
Teneur en œuf réelle	150	150	

[1] Voir le texte.

On notera que la choline lipidique totale ou libérée par la lécithinase D a été dosée uniquement sur la semoule commerciale et les œufs *a* ayant servi à fabriquer la pâte aux œufs. Les valeurs rapportées pour le dosage de la choline totale correspondent, par contre, à des mesures effectuées sur des œufs et des semoules d'origines variées.

Les résultats sont calculés à partir de la formule suivante :

$$T = \frac{3\,800\,(C_p - C_s)}{C_\text{œ} - C_p} \qquad (3)$$

T = teneur en œufs frais (g/kg de semoule) ;
C_p = teneur en choline dans la pâte (mg/g de MS) ;
$C_\text{œ}$ = teneur en choline dans l'œuf (mg/g de MS) ;
C_s = teneur en choline de la semoule (mg/g de MS).

c) *Discussion.*

Le procédé le plus simple est le dosage de la choline totale et c'est celui que nous allons examiner en premier.

L'examen du tableau 2 conduit aux deux remarques suivantes :

— on vérifie, d'une part, que les œufs sont sensiblement plus riches en choline que les semoules. Les différences observées demeurent cependant trop faibles pour permettre un dosage précis. Dans des pâtes aux œufs répondant aux exigences de la réglementation et contenant donc environ 40 g d'œuf sec pour 1 000 g de semoule, celle-ci apporte en effet bien plus de choline (1 450 mg) que l'œuf (600 mg).

— d'autre part, les fluctuations décelées entre les différents échantillons de semoules ou d'œufs que nous avons analysés sont importantes et comparables à celles obtenues par d'autres auteurs (HADORN et JUNGKUNZ, 1953 *a* et *b* ; EECKHAUT, 1968) au cours de la détermination de la teneur en choline dans le seul jaune d'œuf. De ce fait la teneur en œuf calculée à partir des valeurs moyennes est très éloignée de la valeur réelle (tabl. 2). On peut donc avoir des doutes sur la signification réelle des valeurs moyennes 1,45 et 15,3 nécessaires à la résolution de l'équation (3) généralisée.

Le dosage, plus spécifique, de la choline lipidique totale, n'apporte aucune précision supplémentaire à l'analyse. L'évolution de la teneur en choline lipidique totale en fonction du temps d'entreposage, déjà mise en évidence par HADORN et JUNGKUNZ (1952) et que nous avons confirmée (perte de plus de 10 p. 100 de la choline pour des pâtes aux œufs conservées 3 mois à 12 p. 100 d'humidité) rend au contraire les résultats encore plus aléatoires.

Il en est de même pour le dosage, très peu reproductible malgré les précautions expérimentales prises, de la choline libérée par la lécithinase D.

D'une manière générale, il ne semble donc pas que le dosage de la choline par l'une ou l'autre des méthodes étudiées puisse être retenu pour déterminer la teneur en œufs des pâtes.

3. — *Dosage des esters méthyliques des acides gras*

a) *Principe.*

Les lipides totaux extraits par la méthode azéotropique sont soumis à une transestérification. On calcule ensuite la teneur en œuf du produit à partir des teneurs en esters méthyliques des acides gras, déterminées par chromatographie en phase gazeuse.

b) *Résultats.*

Comme dans le cas des lipides totaux, nous avons étudié une série de pâtes de teneur croissante en œufs.

Les résultats de ces dosages sont présentés dans le tableau 3.

Par ailleurs, les teneurs en acides gras des lipides de semoules et d'œufs d'origines différentes sont respectivement données dans les tableaux 4 et 5.

c) *Discussion.*

Bien que pratiquement les mêmes acides gras entrent dans la composition des lipides de l'œuf et de la semoule, leur répartition est sensiblement différente dans

TABLEAU 3

Teneur en acides gras des pâtes alimentaires de teneur croissante en œuf

Résultats exprimés en p. 100 des acides gras totaux

Acides gras	Semoule	Œuf	Pâtes aux œufs contenant					
			40 g Œuf	80 g Œuf	120 g Œuf	140 g Œuf	160 g Œuf	200 g Œuf
C_{16}	25	27	28	26	25	25	25	26
$C_{16:1}$	—	3	0,5	1	2,5	2,5	3	4
C_{18}	2,0	11	3	3	4	4	5	6
$C_{18:1}$	14	44	22	27	31	33	33	33,5
$C_{18:2}$	56	14	43	38	35	34	32	29
$C_{18:3}$	4		2	3	2	2	2,5	3
Teneur en lipides (mg/g de M.S.)	17,8	482	22,3	26,9	32,4	34,5	37,2	41,5
Teneurs en œufs g/kg de semoule	Formule 7 *		41	78	124	144	165	197
	Formule 8 *		47	85	137	159	180	214

* Voir la discussion pour la méthode de calcul de la teneur en œuf.

TABLEAU 4

Teneur en acides gras des lipides de semoules d'origines variées

Résultats exprimés en p. 100 des acides gras totaux

Acides gras	*Montferrier*	*Bidi 17*	*Mandon*	*Agathé*	*Lakota* (Sud)	*Lakota* (Nord)	Valeurs moyennes
C_{16}	23	34	33	24	24	25	27,1
C_{18}	2	1	2	2	1	1	1,5
$C_{18:1}$	13	17	14	11	13	12	13,3
$C_{18:2}$	58	45	45	61	56	60	54,1
$C_{18:3}$	3	2	5	2	5	2	3,1
Lipides totaux (mg/g de M.S.)	18,1	18,3	18,7	17,0	19,2	18,7	18,5

les deux produits. En particulier, et ainsi qu'il ressort des tableaux 4 et 5, les teneurs moyennes en « acides stéarique + oléique » exprimées en p. 100 des acides gras totaux, sont d'environ 52 pour les œufs et de 15 pour les semoules.

La présence d'œufs dans les pâtes se manifeste donc par un accroissement sensible de la teneur en acides stéarique et oléique, d'environ 16 p. 100 des acides totaux pour 100 g d'œuf (tabl. 3).

TABLEAU 5

Teneur en acides gras des lipides d'œufs d'origines variées

Résultats exprimés en p. 100 des acides gras totaux

Acides gras	Œufs *a*	Œufs *b*	Œufs *c*	Œufs *d*	Œufs *e*	Valeurs moyennes
C_{16}	29	27	28	29	25	27,8
$C_{16:1}$	3	3	5	4	4	3,8
C_{18}	10	11	6	7	10	8,8
$C_{18:1}$	46	44	43	42	42	43,4
$C_{18:2}$	11	14	17	16	18	15,2
$C_{18:3}$	1		traces	traces	1	1
Lipides tot. (mg/g de M.S.)	490	481	512	470	487,5	488

S'appuyant sur ces remarques, et en admettant que les teneurs en acide gras des lipides des semoules et des œufs sont identiques, il est possible de calculer la teneur en œuf des pâtes à l'aide des trois équations suivantes :

$$l_s \times OS_s + l_{œ} \times OS_{œ} = L_p \times OS_p \quad (4)$$

$$l_s + l_{œ} = L_p \quad (5)$$

$$T = 1\,000 \frac{l_{œ}}{L_{œ} \times M_{œ}} \quad (6)$$

avec T = teneur en œuf (g d'œuf frais par kg de semoule).
l_s = poids de lipides apporté par la semoule dans la pâte aux œufs (mg/g de MS).
$l_{œ}$ = poids de lipides apporté par l'œuf dans la pâte aux œufs (mg/g de MS)
L_p = teneur en lipides de la pâte aux œufs (mg/g de MS).
$L_{œ}$ = teneur en lipides de l'œuf (mg/g de MS).
OS_s = p. 100 d'acides oléique + stéarique dans les lipides de semoule.
$OS_{œ}$ = p. 100 d'acides oléique + stéarique dans les lipides d'œuf.
OS_p = p. 100 d'acides oléique + stéarique dans les lipides de pâte aux œufs.
$M_{œ}$ = teneur en matière sèche de l'œuf (g/g d'œuf frais) = 0,263.

D'où :

$$T = 3\,800 \times \frac{L_p\,(OS_p - OS_s)}{L_{œ}\,(OS_{œ} - OS_s)} \quad (7)$$

Dans le cas le plus fréquent, où les caractéristiques de la matière première ne sont pas connues, les valeurs exactes OS_s, $L_{œ}$ et $OS_{œ}$ sont remplacées par les valeurs

moyennes correspondantes 15, 448 et 52 calculées à partir des résultats des tableaux 4 et 5.

La formule généralisée (8) ainsi obtenue s'écrit alors :

$$T = 0{,}21 \times L_p\,(OS_p - 15) \qquad (8)$$

Compte tenu des différences de teneur en acides stéarique + oléique des lipides de semoules et d'œufs d'origines variées (tabl. 4 et 5) [1], l'écart entre les teneurs réelles en œufs des pâtes et celles déterminées à l'aide de cette dernière formule peut atteindre ± 10 p. 100 ; la précision est évidemment meilleure par application, rarement possible, de la formule 7.

On notera, par ailleurs, que la teneur T dépend directement de la teneur en lipides L_p et que celle-ci doit donc être déterminée avec soin.

Il est possible d'éviter cette détermination, en calculant T à partir des seules teneurs en acides stéarique + oléique des œufs, des semoules et des pâtes aux œufs.

On obtient, en effet, après transformation des équations (4), (5) et (6) :

$$T = 14{,}44 \quad \frac{OSp - OS_s}{OS_{œ} - OS_p}. \qquad (9)$$

L'utilisation de cette formule conduit cependant à des erreurs encore plus importantes qui tiennent à la nature de la fonction qui lie T à OS_p et au fait que l'erreur relative sur OS_p est supérieure à celle sur L_p. Nous l'avons donc rejetée.

Il aurait été également possible, ainsi que l'ont fait d'autres auteurs (Spiteri *et al.*, 1963 ; Armandola, 1963 et 1964 ; Franciosi et Giovanini, 1964 ; Armandola et Barbero, 1965), d'exprimer la teneur en œufs en fonction de la teneur en acide linoléique ou de tous autres acides gras ou combinaisons d'acides gras. Ainsi qu'il ressort des tableaux 4 et 5, la teneur en acide oléique, à laquelle nous avons ajouté la teneur en acide stéarique en raison du recouvrement partiel des pics de ces deux acides en chromatographie en phase gazeuse, est la plus constante. C'est pourquoi nous estimons préférable d'utiliser la somme acides oléique + stéarique dans nos calculs.

Les acides arachidoniques et palmitoléiques, plus spécifiques de l'œuf, sont en concentration insuffisante pour être dosés d'une manière précise.

Notons enfin que nous avons également étudié les esters méthyliques des acides gras des différents groupes lipidiques (lipides neutres, céphalines, lécithines et lipides plus polaires que la lécithine).

Nous avons constaté que les différences quantitatives observées entre les acides gras des lipides totaux de l'œuf et de la semoule se retrouvaient dans chaque groupe lipidique et n'était donc pas dues à l'un d'entre eux en particulier.

L'importance de cette différence varie néanmoins d'une fraction à l'autre. Nous avons cependant estimé que la légère amélioration de la précision observée en dosant la teneur en acides oléique + stéarique sur un des groupes lipidiques préalablement isolés ne pouvait pas justifier l'introduction dans la méthode d'une opération supplémentaire, à savoir le fractionnement des lipides.

[1] On ne tient pas compte ici des écarts sensibles par rapport à la moyenne que l'on observe dans les œufs après une alimentation lipidique spéciale des poules (Leclercq, 1967 et 1968).

CONCLUSION

Des trois méthodes de dosage des œufs dans les pâtes alimentaires étudiées dans ce mémoire, la première (dosage des lipides totaux) et la troisième (dosage des lipides totaux complété par le dosage en acides oléique + stéarique), nous semblent devoir être retenues alors que la seconde (dosage de la choline) est certainement à écarter.

Le dosage des lipides totaux effectué dans les conditions que nous avons décrites (méthode azéotropique) serait une bonne méthode de contrôle au niveau de la fabrication. Nécessitant un appareillage rudimentaire et peu coûteux, cette méthode pourrait permettre à l'industriel de vérifier la qualité de ses produits. La connaissance qu'il aurait des caractéristiques des matières premières utilisées, œuf et semoule, conduirait alors à une précision tout à fait suffisante.

Le seul dosage des lipides totaux reste cependant insuffisant au niveau de la répression des fraudes, des falsifications par adjonction de lipides étrangers étant indécelables par cette technique.

La détermination complémentaire de la teneur en acides oléique + stéarique, telle que nous l'avons proposée dans la troisième partie de ce travail, permet de surmonter en partie cette difficulté. La teneur en œuf ainsi calculée dépend, en effet, à la fois de la quantité et de la qualité des lipides présents.

Il faut enfin rappeler que les résultats de ces déterminations sont uniquement en relation avec la teneur en jaune d'œufs et qu'il peut être dangereux d'en déduire la teneur en œuf entier, le pourcentage de jaune dans l'œuf n'étant pas constant (Marion *et al.*, 1964).

Nous avons donc été conduits à rechercher une méthode de dosage du blanc. Basée sur le comportement électrophorétique des protéines solubles des pâtes, cette méthode fera l'objet d'une autre publication.

Reçu pour publication en février 1971.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE EGG CONTENT OF NOODLES
I. — BY ANALYSIS OF THE LIPIDIC FRACTION. DOSAGE OF LIPIDS, CHOLINE AND FATTY ACIDS

Different processes of determining the egg content of noodles by analyzing the lipidic fraction are studied.

The results obtained by dosages of lipids, choline and fatty acids have been compared. Determination of total lipids with the azeotropic method gives the most reproducible results, but to reliably detect possible adulterations, analysis of the constituent fatty acids is also necessary.

Dosage of total or lipidic choline is to be ruled out.

RESUMEN

DETERMINACION DEL CONTENIDO EN HUEVOS DE LAS PASTAS ALIMENTICIAS
I. — POR ANALISIS DE LA FRACCIÓN LIPIDICA : DOSIFICACIÓN DE LOS LIPIDOS, DE LA COLINA Y DE LOS ACIDOS GRASOS

En este artículo se procede al estudio de distintos procedimientos de determinación del contenido en huevos de las pastas alimenticias, por análisis de la fracción lipídica.

Se procede a la comparación de los resultados proporcionados por las dosificaciones de los lípidos, de la colina y de los ácidos grasos. La determinación de los lípidos totales por el método azeotrópico proporciona los resultados más reproductibles, pero debe en cambio quedar completada por el análisis de los ácidos grasos constitutivos, con objeto de poner de manifiesto, con la mayor seguridad, los fraudes eventuales.

Deberá descartarse la dosificación de la colina total o lipídica,

RIASSUNTO

DETERMINAZIONE DEL TENORE D'UOVA DELLE PASTE ALIMENTARI
I. — MEDIANTE ANALISI DELLA FRAZIONE LIPIDICA : DOSAGGIO DEI LIPIDI, DELLA COLINA E DEGLI ACIDI GRASSI

Sono allo studio diversi metodi per determinare il tenore d'uova delle paste alimentari mediante analisi della frazione lipidica.

Sono stati comparati i risultati ottenuti mediante dosaggio dei lipidi, della colina e degli acidi grassi. La determinazione dei lipidi totali con il metodo azeotropico dà i risultati più riproducibili, ma deve essere completata dell'analisi degli acidi grassi per scoprire in modo piùsicuro le eventuali frode.

Va scartato il dosaggio della colina totale o lipidica.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALLIOT M., 1958. Sur l'analyse des pâtes alimentaires aux œufs. *Ann. Falsif. Fraudes* (594-596), 151-157.

ARMANDOLA P., 1963-1964. Dosaggio delle uova nelle pasta alimentari. *Tec. Mol.*, **14** (18), 94-96 ; **15** (6), 102-104.

ARMANDOLA P., BARBERO G., 1965. Metodo cromatografico di dosaggio delle uova nelle paste all'uovo. *Tec. Mol.*, **16** (18), 100-106.

CALET C., 1959. Données nouvelles sur l'influence de l'alimentation sur la quantité et la composition des lipides de l'œuf. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **13** (1), A 163-203.

CASSON C., GRIFFIN F., 1959. The determination of egg in certain foods by enzymic hydrolysis of the phospholipids. *Analyst*, **84**, 281-285.

CHIOFFI V., 1966. Spectrophotometric determination of sterols in egg pasta and cholesterol in eggs and powdered eggs. I. Sterol determination in egg pasta. *Boll. Lab. Chim. Prov.*, **17** (6), 788-800.

CUSTOT F., LASNE H., 1960. La teneur en œufs des pâtes aux œufs du commerce. Quelques résultats analytiques. *Ann. Falsif. Fraudes* (619), 400-403.

DAUBNEY C., SEXTON G., 1950. The determination of egg in salad cream. *Analyst*, **75**, 305-309.

DAVIDSON F., LONG C., 1958. The structure of the naturally occuring phosphoglycerides. 4. Action of cabbage leaf phospholipase D on ovolecithin and related substances. *Biochem. J.*, **69**, 458-466.

EECKHAUT R., 1968. Sur le dosage du jaune d'œuf dans les denrées alimentaires. *Ferment.*, **2**, 66-83.

EDWARDS H., FRIGGERS C., DEAN R., CARMON J., 1960. Studies on the cholesterol content of eggs from various breeds and for strains of chickens. *Poultry Sci.*, **39**, 487-489.

FRANCIOSI A., GIOVANNINI G., 1964. La cromatografia in fase di vapore applicata all'analisi delle paste con aggiunta di uova. *Tec. Mol.*, **15** (18), 155-161.

HADORN H., JUNGKUNZ R., 1951. Zur gravimetrischen Bestimmung der Sterin in Eierkonserven und Teigwaren. *Mitt. geb. Lebensm. Hyg.*, **42** (5), 452-458.

HADORN H., JUNGKUNZ R., 1952. Beitrag zur Bestimmung des Eigehaltes von Eierteigwarsen. *Mitt. geb. Lebensm. Hyg.*, **43** (1), 1-49.

HADORN H., JUNGKUNZ R., 1953 *a*. Beitrag zur Bestimmung des Eigehaltes in Eierteigwarsen. *Mitt. geb. Lebensm. Hyg.*, **44** (1), 1-13.

HADORN H., JUNGKUNZ R., 1953 *b*. Über eine gravimetrische Cholinbestimmungsmethode sowie über den Gehalt an Lecithin, Sphingomyelin und Kephalin in Hühnereiern und Eipulvern. *Mitt. geb. Lebensm. Hyg.*, **44** (4), 333-347.

KAHANE E., 1963. Extraction des lipides par un procédé azéotropique. *C. R. Acad. Sci.*, **257**, 1996-1998.

KAHANE E., REGORD M. T., 1964. Sur l'extraction des lipides. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **18** (2), 1-21.

KATES M., 1954. Lecithinase systems in sugar beet, spinach, cabbage and carrot. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 375-389.

KATES M., 1955. Hydrolysis of lecithin by plant plastid enzymes. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 375-389.

LASKOWSKI K., BOLIBOK E., 1967. Méthode colorimétrique de détermination des jaunes d'œufs dans les pâtes alimentaires (en polonais). *Roczn. Panstw. Zakl. Hig.*, **13** (6), 749-753.

LASKOWSKI K., BOLIBOK E., 1968. Méthode colorimétrique de détermination des jaunes d'œufs dans les pâtes alimentaires (en polonais). *Przegl. Zbozwo. Mlyn.*, **12** (1), 9-10.

LECLERQ B., 1967. Utilisation de l'acide élaïdique pour l'étude du métabolisme des lipides chez la Poule pondeuse. *Arch. Sci. Physiol.*, **21** (3), 299-322.

LECLERQ B., 1968. Utilisation de l'huile de colza par la Poule pondeuse ; son influence sur la genèse et la composition des lipides de l'œuf. *C. R. Acad. Sci.*, **267**, 2235-2237.

LECOQ R., 1965. *Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles*. Vol. 2, 1475-1482, Doin, Paris.

MARION W., NORDSKOG A., TOLMAN H., FORSYTHE R., 1964. Egg composition as influenced by beending egg size, age and fenson. *Poultry Sci.*, **43**, 255-265.

MATVEEF M., 1969. I metodi per stabilire il valore industriale dei grani duri realizzati nel laboratorio di Montpellier. *Tec. Mol.*, 639-664.

MORRISON W., SMITH L., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid. Res.*, **5** (4), 600-608.

MUNTONI F., TISCORNIA E., TASSI-MICO C., 1966. Gas-chromatographic study of chemicals in cereals. IV. Determination of eggs in noodles. *Quad. Nutr.*, **26** (1-2), 26-34.

PELAGATTI G., 1966. Determinatione degli steroli nelle paste all'uovo. *Tec. Mol.*, **17** (14), 337-340.

RECH J., 1968. Extraction quantitative des lipides des céréales. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **22** (1), 11-15.

ROBERTS L., 1968. Fluorometric determination of sterols as cholesterol in egg noodles : collaborative study. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **51** (6), 1220-1224.

SPITERI J., CASTANG J., SOLÈRE M., 1963. Dosage des œufs dans les pâtes alimentaires. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **56**, 93-98.

STAUFER L., 1967. Updating analytical constants for egg content of food. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **50**, 851.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 89-94.

NOTE TECHNIQUE

ESTIMATION DE LA FRÉQUENCE D'UNE SOUCHE DANS UNE POPULATION MICROBIENNE

Roselyne LUMARET et P. GALZY

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique, I. N. R. A.,
École nationale supérieure agronomique
34 - Montpellier

RÉSUMÉ

Un test statistique classique permet de déterminer l'erreur commise sur l'estimation de la fréquence d'une souche dans une population.

Un tableau indique le nombre minimal de cellules à étaler pour ne pas dépasser une erreur choisie à l'avance.

Mots clés : *Statistiques, microorganismes.*

I. — INTRODUCTION

Il est souvent nécessaire de connaître la fréquence d'une souche dans une population microbienne. Ce problème se pose dans l'industrie pour contrôler le devenir d'une souche utilisée dans le but d'améliorer le processus fermentaire. Il peut se poser également au laboratoire pour contrôler, par exemple, la fréquence relative d'un mutant dans un mélange au cours de la multiplication végétative.

Cette note a pour but d'indiquer, *a priori*, l'importance de l'échantillon à prélever pour obtenir la fréquence avec une précision fixée à l'avance. En effet, l'erreur sur la fréquence est directement liée, d'une part à la valeur de cette fréquence, d'autre part au nombre de cellules de l'échantillon.

II. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES D'APPLICATION DES CALCULS PROPOSÉS

Le calcul qui va être exposé ci-dessous implique la possibilité de reconnaître les cellules de la souche étudiée dans la population. Deux cas simples peuvent se présenter. La souche étudiée peut être directement reconnaissable par une caractéristique morphologique : par exemple, chez

les levures, des mutants colonies lisses peuvent apparaître dans une souche qui présente habituellement des colonies plissées en culture sur certains substrats. Il suffit alors d'étaler un échantillon de la population en présence du substrat considéré : un comptage direct des colonies lisses et des colonies plissées est facile. Si la souche étudiée n'est reconnaissable que par un caractère physiologique, il peut être nécessaire de recourir au *replica plating*. L'échantillon est étalé sur un milieu complet, mais répliqué sur le milieu test. Le comptage des colonies apparues sur le milieu complet donne le nombre de cellules viables de l'échantillon. Le comptage des colonies sur le milieu test donne le nombre de cellules, soit de la souche étudiée, soit du reste de la population. De toute façon, on obtient ainsi la fréquence de la souche étudiée. Éventuellement, d'autres méthodes d'estimation de cette fréquence peuvent être utilisées. Cependant, il est nécessaire que ces méthodes n'apportent pas une erreur expérimentale importante ou incontrôlable. Par exemple, il n'est pas possible d'étaler deux échantillons différents, l'un sur un milieu complet permettant la numération de la population totale, et l'autre sur un milieu permettant la numération de la souche étudiée. En effet, le calcul ci-dessous tient compte de la fluctuation de l'échantillon, mais ne peut évaluer l'erreur expérimentale commise en prélevant dans la même population deux échantillons réputés identiques.

III. — CALCUL STATISTIQUE

Appelons :

x le nombre de cellules de la souche étudiée dans l'échantillon,
X le nombre total de cellules de cet échantillon.

Le rapport observé $p_0 = \frac{x}{X}$ est distribué selon la loi hypergéométrique puisque les prélèvements sont exhaustifs, c'est-à-dire que la même cellule ne peut pas être prélevée deux fois. Mais ce rapport peut être considéré comme distribué selon une loi binomiale de moyenne p et de variance $\frac{p(1-p)}{X}$ car X est très petit par rapport à la population toute entière. On désigne par p la valeur théorique de la fréquence de la souche étudiée. Il est admis généralement que ce rapport $p_0 = \frac{x}{X}$ est, par approximation, distribué selon une loi normale, à condition que le nombre de cellules X soit assez grand pour vérifier les relations suivantes :

$$p_0 X \geqslant 20 \qquad (1)$$

et

$$(1 - p_0)X \geqslant 20. \qquad (2)$$

Dans ce cas, la fonction de répartition a pour moyenne p et pour écart type :

$$\sqrt{\frac{p(1-p)}{X}}$$

et de ce fait, le rapport :

$$\varepsilon = \frac{|p_0 - p|}{\sqrt{\frac{p(1-p)}{X}}}$$

est une variable normale réduite de moyenne 0 et de variance 1. On admet que la probabilité pour que le rapport ε soit compris entre $-\varepsilon_\alpha$ et $+\varepsilon_\alpha$ est égal à $1 - \alpha$.

α est le risque choisi ;

ε_α est la valeur de ε correspondant au risque α. Elle est obtenue dans les tables de l'écart réduit (loi normale).

Choisissons pour α la valeur de 5 p. 100. Dans ce cas, $\varepsilon_\alpha = 1{,}960$. Si les relations (1) et (2) sont vérifiées, il est possible d'assimiler p à p_0 pour le calcul de l'erreur e.

On a alors une probabilité de 95 p.100 pour que :

$$p_0 - 1{,}96\sqrt{\frac{p_0(1-p_0)}{X}} < p < p_0 + 1{,}96\sqrt{\frac{p_0(1-p_0)}{X}}$$

L'erreur commise sur p est :

$$e = 1{,}96\sqrt{\frac{p_0(1-p_0)}{X}}$$

Les calculs correspondent à une méthode classique dont le détail pourra être trouvé dans les manuels de statistique (DUBOS, 1965 et 1969 ; SCHWARTZ, 1963).

IV. — RÉSULTATS

Connaissant le nombre X de cellules de l'échantillon, il est donc possible de calculer l'erreur e commise sur la fréquence $p_0 = \frac{x}{X}$ de la souche étudiée.

Il est aussi possible de se fixer une valeur maximale de l'erreur sur ce rapport et de calculer le nombre minimal X de cellules qu'il faut avoir dans l'échantillon pour ne pas dépasser cette erreur. Les résultats de ce type de calcul sont groupés dans le tableau donné. Ce tableau indique, pour diverses valeurs de l'erreur variant de 0,01 à 0,15 et pour différentes valeurs théoriques de la fréquence $\frac{x}{X}$ comprises entre 0,10 et 0,50, le nombre de cellules que doit contenir l'échantillon.

Pour des fréquences p ou p_0 supérieures à 0,5, l'erreur commise, et par conséquent l'effectif minimal de l'échantillon pour ne pas dépasser cette erreur, seront les mêmes que pour les fréquences $(1 - p)$. Si la fréquence relative d'une souche est 0,7 par exemple, l'erreur est la même que celle correspondant à une fréquence de 0,3.

Les erreurs commises sur des fréquences faibles (inférieures à 0,1) n'ont pas été représentées dans le tableau parce que, dans ce cas, la distribution des fréquences ne peut plus être considérée comme normale : elle se fait selon la loi de Poisson. Dans ce dernier cas, l'effectif minimal de l'échantillon pour avoir une bonne estimation de la fréquence devient trop important pour que l'expérimentation puisse être aisément conduite.

Les valeurs d'un tableau sont nécessairement discontinues ; aussi, celui-ci a été complété par un graphique qui donne le nombre de cellules de l'échantillon en fonction de la valeur maximale de l'erreur admise. Pour rendre la courbe linéaire, on indique, en ordonnée le nombre de cellules de l'échantillon, et en abscisse l'inverse du carré de l'erreur. Chaque droite correspond à une valeur particulière de la fréquence $\frac{x}{X}$ de la souche étudiée.

Ce graphique permet de connaître immédiatement, par simple lecture, en fonction du nombre de cellules de l'échantillon et de la fréquence de la souche étudiée, l'erreur commise sur la fréquence.

TABLEAU I

Nombre minimal de cellules vivantes que doit comporter l'échantillon pour que l'erreur ne dépasse pas la valeur e *lorsque la fréquence est* p *ou* p_0

Les nombres en italique et soulignés correspondent aux cas où les relations 1 et 2 ne sont pas vérifiées, mais où les valeurs restent encore pratiquement acceptables. (On a dans ce cas $Xp \geqslant 10$ et $X(1 - p) \geqslant 10$).

$\frac{1}{e^2}$	e	p ou p_0								
		0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
10 000	0,01	3 456	4 896	6 144	7 200	8 064	8 736	9 216	9 504	9 600
2 500	0,02	864	1 224	1 536	1 800	2 016	2 184	2 304	2 376	2 400
1 111	0,03	384	544	683	800	896	971	1 024	1 056	1 067
625	0,04	216	306	384	450	504	546	576	594	600
400	0,05	*139*	196	246	288	323	350	368	381	384
277	0,06		136	171	200	224	243	256	264	267
204	0,07		*100*	126	147	165	179	189	194	196
156	0,08		*77*	96	113	126	137	144	149	150
123	0,09			*76*	89	100	108	114	118	119
100	0,10			*62*	*72*	81	88	93	96	96
82	0,11			*51*	*60*	67	73	77	79	80
69	0,12				*50*	*56*	61	64	66	67
59	0,13				*43*	*48*	*52*	55	57	57
51	0,14					*42*	*45*	*48*	49	49
44	0,15						*39*	*41*	*43*	43

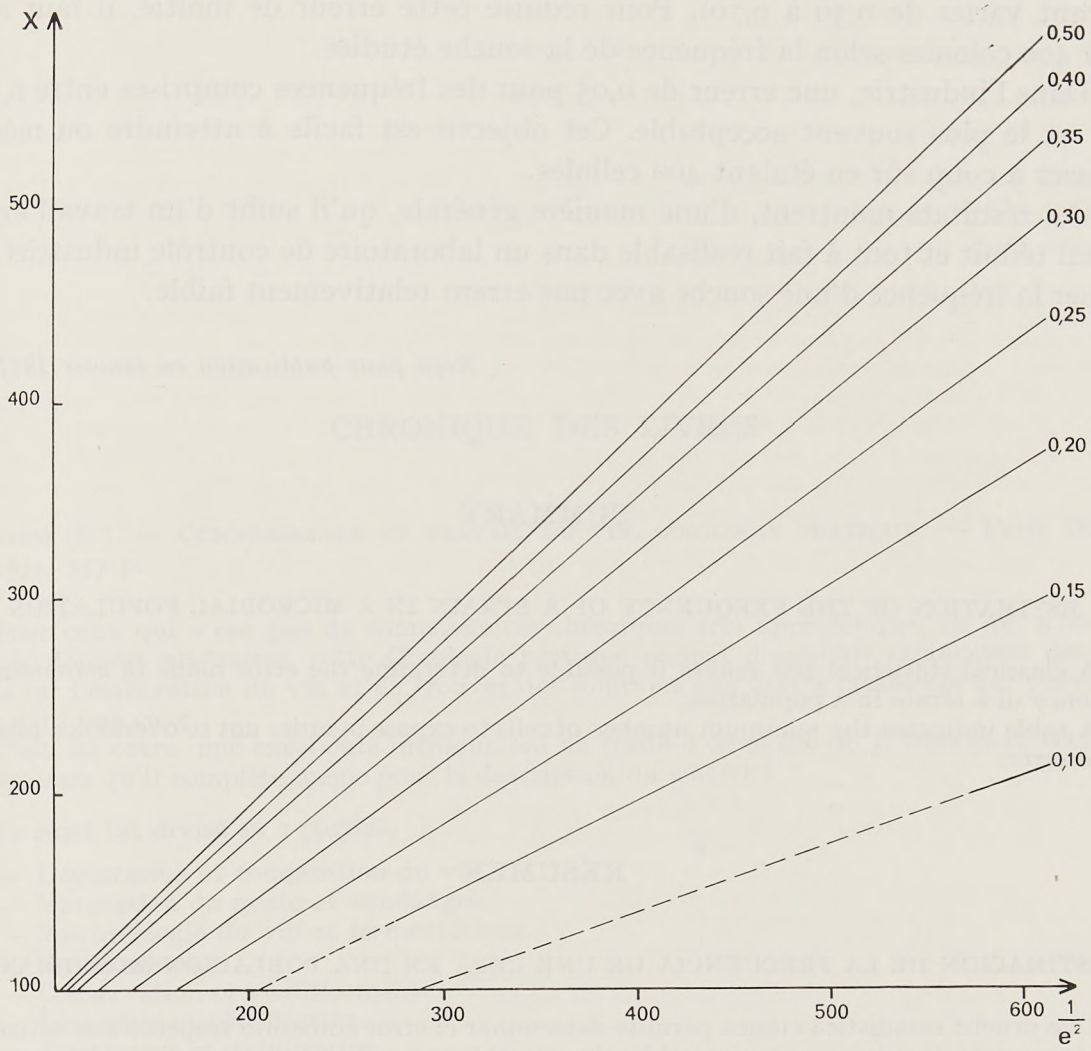


FIG. 1. — *Variation du nombre de cellules de l'échantillon* (X) *en fonction de l'inverse du carré de l'erreur* $\frac{1}{e^2}$ *pour diverses valeurs de la fréquence comprises entre 0,10 et 0,50.*
La droite est en tirets lorsque les relations 1 et 2 ne sont pas vérifiées.

V. — DISCUSSION ET CONCLUSION

En principe, ce n'est que dans le cas où la valeur de la fréquence est connue que le nombre de cellules à étaler peut être précisé rigoureusement grâce au tableau ou au graphique.

Cependant, dans le cas très fréquent où on ne connaît pas cette fréquence, il suffit de poser *a priori* que cette dernière est égale à 0,5 et l'on prélève ainsi un échantillon dont l'effectif possède la valeur maximale pour l'erreur choisie ; l'erreur réelle sera donc inférieure ou tout au plus égale à celle souhaitée, et sera évaluée *a posteriori* après le dénombrement de l'effectif de l'échantillon.

D'une façon générale, le tableau et le graphique indiquent que l'étalement d'une centaine de cellules ne permet d'obtenir la fréquence $\frac{x}{X}$ d'une souche dans une population qu'avec une mauvaise précision (erreur absolue de 0,10 sur des fréquences

pouvant varier de 0,30 à 0,70). Pour réduire cette erreur de moitié, il faut étaler 200 à 400 colonies selon la fréquence de la souche étudiée.

Dans l'industrie, une erreur de 0,05 pour des fréquences comprises entre 0,15 et 0,85 est le plus souvent acceptable. Cet objectif est facile à atteindre ou même à dépasser à coup sûr en étalant 400 cellules.

Ces résultats montrent, d'une manière générale, qu'il suffit d'un travail expérimental réduit et tout à fait réalisable dans un laboratoire de contrôle industriel pour estimer la fréquence d'une souche avec une erreur relativement faible.

Reçu pour publication en janvier 1971.

SUMMARY

ESTIMATION OF THE FREQUENCY OF A STRAIN IN A MICROBIAL POPULATION

A classical statistical test makes it possible to determine the error made in estimating the frequency of a strain in a population.

A table indicates the minimum number of cells to expose in order not to overlook a predetermined error.

RESUMEN

ESTIMACION DE LA FRECUENCIA DE UNE CEPA EN UNA POBLACION MICROBIANA

Une prueba estadística clásica permite determinar el error cometido respecto a la estimación de la frecuencia de una cepa en una población microbiana.

Una tabla indica el número mínimo de células a extender para no sobrepasar un error determinado de antemano.

RIASSUNTO

VALUTAZIONE DELLA FREQUENZA DI UN STRETTO IN UNA POPOLAZIONE MICROBICA

Un classico test statistico permette di determinare l'errore commesso sulla stima della frequenza di un stretto in una popolazione microbica.

In una tabella è indicato il numero di cellule da esporre per non superare un errore scelto in anticipo.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUBOS J., 1965. *Méthodologie économique et technique statistique.* (3), 35-36. Institut de Préparation aux Affaires, Montpellier.

DUBOS J., 1969. *Cours de statistique appliquée.* (2), 191-194. École nationale supérieure agronomique, Montpellier.

SCHWARTZ D., 1963. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.* 45-53. Éditions médicales Flammarion, Paris.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (1), 95-96.

CHRONIQUE DES LIVRES

PEYNAUD (E.). — CONNAISSANCE ET TRAVAIL DU VIN. ŒNOLOGIE PRATIQUE. — Paris, Dunod, 1971, 357 p.

Pour ceux qui n'ont pas de connaissances théoriques très approfondies, ou qui n'ont que faire de données abstraites, cette Œnologie pratique permet d'acquérir rapidement des idées claires sur l'élaboration du vin et de trouver des solutions aux divers problèmes qui peuvent se poser dans une cave.

C'est, en outre, une excellente introduction au traité d'œnologie de J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD qu'il complète même pour la description du matériel.

Le sujet est divisé en 7 parties.

— Dégustation et composition du vin.
— Maturation du raisin et vendanges.
— Microbiologie du vin et fermentations.
— Vinifications.
— Conservation et vieillissement.
— Limpidité et clarification.
— Traitement et stabilisation.

Bien que ne comportant pas d'index des matières, il est très facile de trouver le renseignement désiré, sans avoir à lire tout un chapitre.

Chaque chapitre comporte les indications générales et les précisions sont apportées par des cas concrets que l'auteur nous propose. C'est ainsi que nous voyons clairement quelle désacidification on peut obtenir avec un gramme de carbonate de calcium dans un vin donné. Ces exemples sont présentés dans de nombreux encarts qui se suffisent à eux mêmes pour la compréhension.

Le souci pédagogique apparaît encore dans certains cadres hors-texte, où l'on trouve, face à face, les avantages et les inconvénients d'une pratique ou d'un matériel. Parfois même, une conclusion est proposée pour expliquer des points de vue différents.

Cet ouvrage se veut pratique et moderne, on n'y développe pas les techniques anciennes, maintenant abandonnées. On ne parle pas des pratiques qui ne sont pas actuellement autorisées en France. On donne une bibliographie réduite à l'essentiel à la fin de chaque chapitre.

Résultat de 40 ans d'expérience, ce livre écrit avec simplicité et clarté, présenté de facon très attrayante, peut devenir le manuel d'œnologie des élèves des lycées agricoles et le guide de nombreux viticulteurs qui ne laissent pas à d'autres le soin et le souci de vinifier leur récolte.

D. P.

MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS AND TESTING METHODS FOR IRRADIATED FOOD. — REPORT OF A PANEL OF EXPERTS ORGANIZED BY THE FAO AND IAEA IN COLLABORATION WITH IMAS. — Vienna, IAEA, 1970, 121 p. (Technical reports series n° 104).

Dix-neuf experts de 13 pays se sont réunis pour comparer les diverses techniques d'irradiations utilisées dans la plupart des pays et évaluer :

a) l'efficacité des diverses doses dans la conservation des denrées,
b) la qualité microbiologique des produits traités,

c) les tolérances sur la teneur en bactéries et champignons des denrées,
d) la composition de divers milieux de culture.

Cet ouvrage peut servir à promulguer une législation mondiale sur les denrées irradiées.

TRAINING MANUAL ON FOOD IRRADIATION TECHNOLOGY AND TECHNIQUES. JOINT FAO/IAEA DIVISION OF ATOMIC ENERGY IN FOOD AND AGRICULTURE. — Vienna, IAEA, 1970, 134 p. (Technical Reports Series n° 114).

L'utilisation des radiations ionisantes pour la conservation des denrées alimentaires s'est beaucoup développée au cours des 16 dernières années. Cette méthode est séduisante car elle n'endommage pas les produits et ne laisse pas non plus de résidus chimiques néfastes.

Le besoin en technologistes spécialistes des irradiations s'est tellement fait sentir, qu'un premier cours sur ce sujet a été organisé en 1967 conjointement par l'Agence internationale pour l'Énergie atomique, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, et la Commission de l'Énergie atomique aux États-Unis. Le succès remporté par ce premier cours a conduit les trois organisations à la renouveler en 1969 et à éditer cet ouvrage destiné à être utilisé pendant les cours suivants.

Le manuel est divisé en 2 parties :

— la première traitant d'informations générales et de discussions sur les applications des irradiations dans la préservation des aliments.
— La seconde consiste en des exercices de laboratoire.

J. L.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) : *Résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* en anglais destiné à être traduit comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 5,5 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve à corriger.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Le Directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 7-71

Dépôt légal: 3e trimestre 1971. N° d'impression: 691.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1971

Vol. 20. N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 103-110.

ACIDE OLÉANOLIQUE, FACTEUR DE CROISSANCE ANAÉROBIE DE LA LEVURE DE VIN

P. BRÉCHOT, J. CHAUVET, P. DUPUY, Madeleine CROSON et Arlette RABATU

Laboratoire des Fermentations, Institut Pasteur, 75 - Paris (15e)

Station de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches I. N. R. A., 21-Dijon

Cuvage Chauvet Frères, 71 - La-Chapelle-de-Guinchay

RÉSUMÉ

La pruine qui couvre les baies de raisins contient un facteur augmentant la croissance anaérobie des levures. Le constituant le plus abondant extrait des raisins frais par le chloroforme est un produit oxyterpénique, l'acide oléanolique. Il cristallise à partir de solutions dans l'alcool chaud et peut être purifié par chromatographie préparative en couche mince. Son action a été comparée à celle de l'ergostérol en présence et en absence d'acide oléique. *S. cerevisiae* cultivé en aérobiose croît plus vite et fait fermenter plus de sucre dans un milieu contenant de l'acide oléanolique, lorsque l'on compare les résultats à ceux obtenus en présence d'ergostérol qui aét é reconnu comme un facteur de croissance par ANDREASEN et STIER (1954).

Ce résultat peut expliquer pourquoi il se produit une multiplication importante des levures, même dans les cas où les raisins sont placés en anaérobiose dès la mise en cuve.

Mots clés : *acide oléanolique, levures, croissance anaérobie, fermentation, vinification.*

INTRODUCTION

Nous avons montré dans un travail antérieur (BRÉCHOT *et al.*, 1966) qu'un extrait de pruine de la baie de raisin peut agir comme facteur de croissance anaérobie de la levure, cultivée sur moût de raisin.

RADLER a fait une étude chimique systématique des composants de la pruine ou cire cuticulaire de la baie de raisin : la moitié de celle-ci est constituée par un acide oxytriterpénique, l'acide *d*-oléanolique, l'autre moitié étant représentée par des paraffines, aldéhydes, acides gras non saturés et saturés de poids moléculaire

élevé, esters, alcools de poids moléculaire élevé (RADLER, 1968). La parenté de structure de l'acide oléanolique avec l'ergostérol (fig. 1), la présence de cet acide et des acides gras non saturés dans la pruine du raisin, permettent de se demander si ce stéroïde, seul ou associé avec l'acide oléique, ne peut pas jouer un rôle dans la croissance anaérobie de la levure à l'image des facteurs lipidiques d'ANDREASEN et STIER (1953, 1954). C'est ce que notre étude a essayé de montrer.

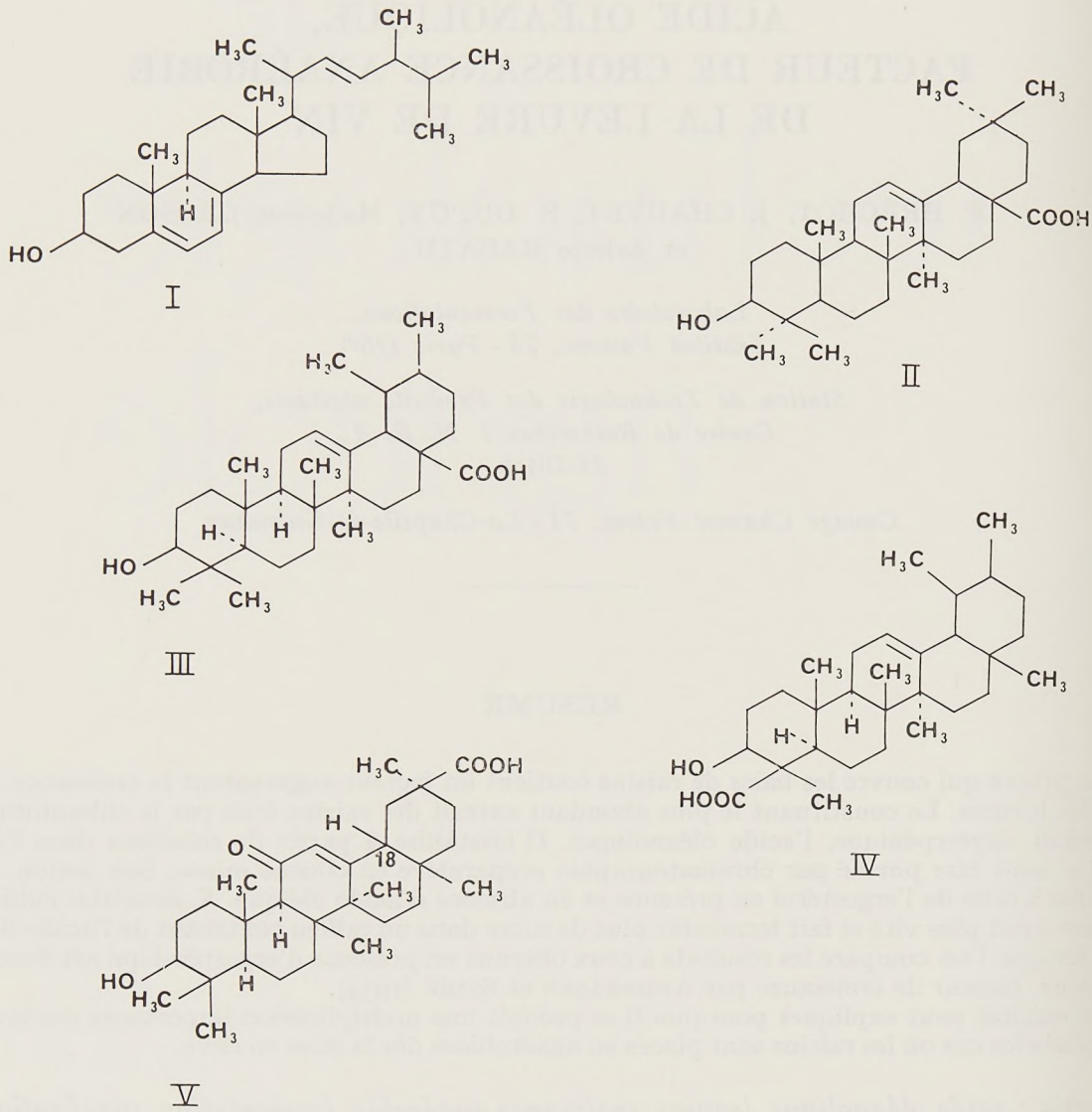


FIG. 1. — *Structures de quelques composés naturels apparentés à l'acide oléanolique*

I	Ergostérol	$C_{28}H_{44}O$	PM = 396,63	Pt fusion = 166-183°C
II	Ac. oléanolique	$C_{30}H_{48}O_3$	PM = 456,68	Pt fusion = 310°C
III	Ac. ursolique	$C_{30}H_{48}O_3$	PM = 456,68	Pt fusion = 285-288°C
IV	Ac. boswellique	$C_{30}H_{48}O_3$	PM = 456,68	Pt fusion = 238-240°C
V	Ac. glycyrrhétinique	$C_{30}H_{46}O_4$	PM = 470,67	Pt fusion = 335°C

MÉTHODES ET TECHNIQUES

1. — *Isolement et purification de l'acide oléanolique*

L'acide oléanolique, qui n'existe pas dans le commerce, a été préparé par nos soins. On prélève à la vigne des grappes de raisin parfaitement saines, les précautions sont prises pour que la pruine des baies reste intacte jusqu'à l'extraction chloroformique (RADLER, 1965). Suivant les

indications de RADLER (1969), l'extrait chloroformique est repris par l'éther de pétrole à froid, la fraction insoluble est dissoute dans l'alcool chaud, décolorée au charbon végétal Norit et filtrée à chaud. L'acide oléanolique cristallise à froid dans ce filtrat. Une deuxième cristallisation, après traitement au charbon végétal, est nécessaire pour avoir un produit blanc.

L'acide oléanolique ainsi obtenu est loin d'être pur. La chromatographie sur plaque de silicagel G, pour un mélange : benzène 70, acétate d'éthyle 29, acide acétique 1 p. 100, permet de mettre en évidence 3 taches, après révélation à chaud à l'acide sulfurique. La tache inférieure, Rf = 0,44, la plus importante, se révèle en rouge foncé; elle correspond à l'acide oléanolique. Deux taches supérieures, Rf = 0,50 et Rf = 0,65, se révèlent en rose; elles correspondent à des produits présents en quantité beaucoup plus faible et n'ont pu être identifiées.

La purification de l'acide oléanolique est obtenue en employant le même système de chromatographie en couche mince à l'échelle préparative. On charge avec 50 mg d'acide oléanolique en solution chloroformique des plaques 20 × 20 cm, de 1 mm d'épaisseur de silicagel. Les bords des plaques sont révélés et le milieu de la bande, correspondant à l'acide oléanolique, est recueilli. La poudre ainsi séparée est extraite à 35°C par l'acétate d'éthyle à 2 p. 100 d'acide formique. Le liquide est séparé par centrifugation et concentré par évaporation sous vide. Le produit ainsi obtenu donne une seule tache après chromatographie dans divers solvants et son spectre de masse correspond à celui de l'acide oléanolique.

2. — *Souche de levure*

La souche utilisée (*Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoïdeus*) est la même que celle employée antérieurement (BRÉCHOT *et al.*, 1966).

3. — *Milieu de culture*

Le milieu de culture utilisé au cours de nos essais de croissance est un milieu chimiquement défini (HALVORSON *et al.*, 1966) : PO_4H_2K 3,0 g ; $SO_4(NH_4)_2$ 8,0 g ; $CaCl_2$ 0,2 g ; $MgCl_2$ 0,2 g ; bitartrate de potassium 4,0 g [1] ; 1 ml de solution minérale; eau distillée q.s.p. 1 litre. Stériliser à 120°C, 20 minutes.

Solution minérale : $MgSO_4$ 2 g ; NaCl 1 g ; $FeSO_4,7\ H_2O$ 0,5 g ; $ZnSO_4,7\ H_2O$ 0,5 g ; $MnSO_4,3\ H_2O$ 0,5 g ; $CuSO_4,5\ H_2O$ 0,05 g ; eau distillée q.s.p. 1 litre ; + SO_4H_2 dilué pour dissoudre l'insoluble.

Solution de vitamines : biotine 0,1 mg ; pantothénate de Ca 30 mg ; pyridoxine 330 mg ; acide nicotinique 330 mg ; inositol 330 mg ; thiamine 330 mg ; acide folique 30 mg ; acide paraaminobenzoïque 330 mg ; eau distillée q.s.p. 100 ml ; dissoudre l'insoluble avec du bicarbonate de sodium. Stériliser par filtration.

Le glucose est ajouté à part, stérilement, de façon à obtenir une concentration finale de 100 g/l.

La solution de vitamines est ajoutée de même, 1 ml/l. Le pH du milieu de culture est 3,4.

Ce milieu de culture est additionné au moment de l'ensemencement des différents facteurs testés ; leur concentration finale respective est la suivante : ergostérol : 86 mg/l (0,217 mM) ; acide oléanolique : 100 mg/l (0,219 mM) ; acide oléique : 20 mg/l.

La concentration d'acide oléanolique représente, selon RADLER (1969), environ le 1/4 de la quantité maximale possible dans un kilogramme de raisin. Ce stéroïde, très peu soluble, n'a pu être utilisé à une concentration supérieure ; de plus, des essais d'orientation préliminaire avaient montré que cette concentration paraissait optimale. La concentration en acide oléique est la concentration maximale possible dans le raisin, selon RADLER (1965).

Ces différents adjuvants de croissance ont été ajoutés à partir d'une solution alcoolique conservée à 4-5°C : acide oléanolique : 5 g/l ; ergostérol (du commerce) : 4,3 g/l ; acide oléique pur (du commerce) : 1 g/l.

Afin d'éviter de surcharger le milieu de culture en alcool, lorsque ces adjuvants ont été ajoutés ensemble, une seule solution a été utilisée, contenant chacun d'eux à la concentration indiquée, la quantité d'alcool éthylique ainsi mise en œuvre dans tous les cas, même dans le témoin, mesurée en volume à 20°C, était égale à 2 p. 100. Tous les essais de culture ont été faits à 28°C.

4. — *Mise en évidence de l'action de l'acide oléanolique sur la croissance anaérobie de la levure*

a) *Essais qualitatifs en gélose profonde.*

[1] L'acide succinique a été remplacé par le bitartrate de potassium.

Dans des tubes Prévot (9 mm × 180 mm) fermés par un bouchon d'aluminium à vis, on répartit le milieu de culture à tester, gélosé à 2,5 p. 100, à raison de 6 ml par tube.

Selon la technique classique de culture des bactéries anaérobies, on ensemence :

3 tubes témoins
3 — ergostérol
3 — ergostérol + acide oléique
3 — acide oléanolique
3 — acide oléanolique + acide oléique
3 — acide oléique

L'inoculum est constitué par une suspension de levures (50×10^6 cel/ml) dans l'eau physiologique, provenant d'une préculture développée en 18 heures sous gaz carbonique, à la surface d'une gélose inclinée (milieu de culture sans les adjuvants).

b) *Essais quantitatifs en milieu liquide sous azote.*

Ces essais ont lieu stérilement dans des fioles Fourneau de 60 ml à raison de 30 ml par fiole du milieu de culture à tester. Ces fioles étaient ensemencées avec la même suspension que celle utilisée pour les tubes Prévot : la richesse cellulaire dans les fioles était 1×10^6/ml.

Celles-ci étaient bouchées avec un bouchon de caoutchouc à deux trous; par chacun d'eux passe un tube de verre, l'un plonge dans le liquide et sert à introduire l'azote, l'autre coupé au ras du bouchon joue le rôle de tube de dégagement avec soupape de Hg (Slonimsky, 1945). L'anaérobiose dans les fioles est réalisée par barbotage pendant une heure d'un courant d'azote enrichi de CO_2 (azote R de la Société Air Liquide + CO_2 10 p. 100). Le barbotage terminé, on obturait avec un petit agitateur la partie supérieure du tube adducteur de gaz. Les fioles étaient agitées à la main deux fois par jour.

Les déterminations suivantes ont été faites au cours de nos essais :

La croissance cellulaire a été déterminée à l'aide de la cellule de Petroff (Microscope Wild, objectif contraste de phase 40, oculaire grand champ 15, grossissement final 750). Le nombre de cellules de levure compté par champ n'était pas inférieur à 200 cellules. Tout bourgeon cellulaire d'une taille approximativement supérieure aux 2/3 de celle de la cellule était compté comme cellule entière.

Le glucose a été dosé par la méthode iodométrique de Somogyi (1945).

Chaque détermination a été faite aux temps zéro, 24 et 48 heures, portant sur deux exemplaires dont on prenait la moyenne.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours des essais qualitatifs en gélose profonde permettent les constatations suivantes : les tubes de culture, 24 et 48 heures, révèlent un effet plus marquant de l'acide oléanolique que celui de l'ergostérol; il en est de même du mélange acides oléanolique-oléique vis-à-vis du mélange ergostérol-acide oléique. En présence du stéroïde seul ou associé avec l'acide oléique, la fragmentation de la gélose, liée au dégagement gazeux et à la croissance, devient si intense qu'elle se traduit par un émiettement généralisé du milieu solide, comme le montre la photographie des tubes de l'expérience 2 après 48 heures (fig. 2).

Dans le tableau 1 (exp. 1 et 2) sont consignés les résultats obtenus au cours des essais quantitatifs réalisés en anaérobiose, comportant des témoins aérobies et anaérobies. On observe l'efficacité respective des divers facteurs essayés sur la croissance anaérobie. L'acide oléanolique a une action indéniable, supérieure même à celle de l'ergostérol. Il en est de même pour le mélange acides oléanolique-oléique, comparé au mélange ergostérol-acide oléique. La présence du stéroïde permet une multiplication cellulaire plus importante : en 48 heures le nombre des cellules peut être doublé ou triplé par rapport à celui du témoin anaérobie, même dépasser celui du témoin aérobie.

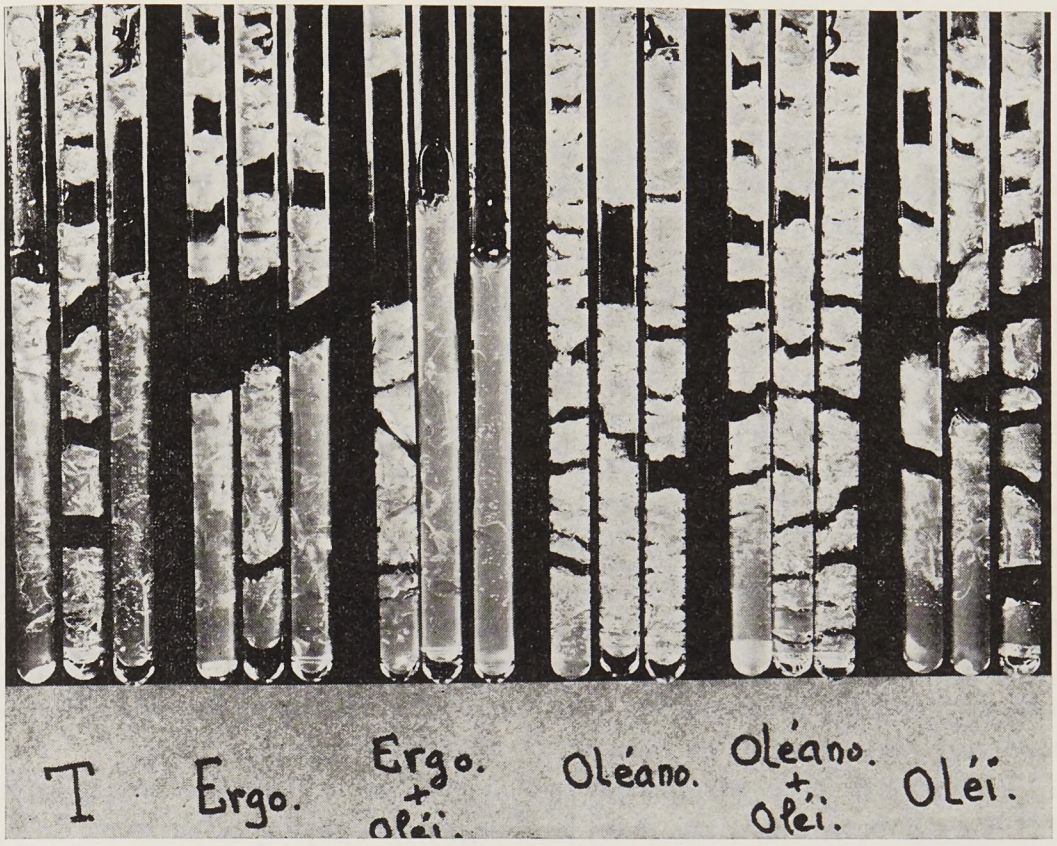


FIG. 2. — *Cultures de* S. cerevisiae (exp. 2,48 h) *en gélose profonde dans des tubes témoins et supplémentés en ergostérol, acide oléique et acide oléanolique*
(Cliché du Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur)

TABLEAU I

Influence de l'addition d'acide oléanolique, d'ergostérol et d'acide oléique sur la fermentation d'un m lieu synthétique

I : cellules de levure en 10^6/ml
II : glucose disparu en p. 100 du glucose initial

	Heures	Expérience 1				Expérience 2			
		Aérobiose		Anaérobiose		Aérobiose		Anaérobiose	
		I	II	I	II	I	II	I	II
Témoin	24	105	43,4	63	35,1	140	41,9	52	34,0
	48	124	91,3	67	59,2	166	97,5	56	65,8
Ergostérol	24			51	29,7			57	35,5
86 mg/l	48			74	57,7			68	67,4
Ergostérol	24			76	36,4			80	33,6
+ acide oléique	48			83	74,4			86	76,9
Acide oléanolique	24			91	47,1			87	44,1
100 mg/l	48			90	62,6			100	86,3
Acide oléanolique	24			164	63,0			70	48,1
+ acide oléique	48			197	88,8			106	92,5
Acide oléique	24			88	43,4			57	50,1
20 mg/l	48			66	63,4			75	75,4

Pour ce qui est de la dégradation anaérobie du glucose, on constate que les chiffres, après 48 heures de culture, sont également en faveur de l'acide oléanolique bien que l'efficacité en soit moins marquée ; néanmoins le mélange acides oléanolique-oléique a une action favorisante incontestable ; c'est dans ce dernier cas, seul, que la disparition du glucose est comparable à celle observée dans l'air.

Tous ces résultats établissent clairement que l'acide oléanolique, seul ou associé à l'acide oléique, favorise la croissance anaérobie de la levure.

Lorsque ce travail a été commencé, on a obtenu des résultats contradictoires, certaines préparations d'acide oléanolique se révélant sans action sur la croissance anaérobie des levures. Le phénomène n'a pu être mis en évidence d'une façon reproductible qu'à partir du moment où la purification de l'acide oléanolique a été suffisamment poussée. On peut supposer que des inhibiteurs, peut-être résidus de pesticides, présents dans le produit impur, perturbaient les essais.

La question se pose de savoir comment cet acide oxytriterpénique intervient dans le métabolisme levurien, réactions de synthèse ou réactions de dégradation associées aux synthèses des glucides, lipides, protéines, nucléoprotéines. On sait que les stérols liés aux particules et à la membrane, sont des constituants de la cellule de levure, dont le rôle physiologique est encore mal connu et devrait être précisé : supports d'enzymes, facteurs de perméation (MAUGENET *et al.*, 1964).

Or, la synthèse de l'ergostérol ne peut se réaliser qu'en aérobiose. En anaérobiose, la levure doit trouver dans le milieu l'ergostérol déjà synthétisé ou un produit de la série des stéroïdes qui lui permette de le synthétiser en l'absence d'oxygène.

On peut également se demander si d'autres acides oxytriterpéniques isomères, acides ursolique et boswellique, ou de structure voisine, acide glycyrrhétinique, ont une action analogue (fig. 1).

Enfin il est à remarquer que, si l'action hormonale des stéroïdes est bien connue dans la physiologie des êtres supérieurs, le rôle de ceux-ci dans les phénomènes de synthèses au niveau de la cellule microbienne et levurienne ne semble pas avoir encore été abordé. Néanmoins les transformations des stéroïdes par les microorganismes, en vue de préparations hormonales, ont fait l'objet de travaux qui ont eu déjà leur application industrielle (PERLMAN, 1967).

D'autre part, du point de vue œnologique, cette action de l'acide oléanolique pourrait venir à l'appui du bien-fondé de la méthode de vinification beaujolaise avec sa variante la macération carbonique où la vendange est encuvée entière, sans foulage, dans une atmosphère de gaz carbonique initiale dès le remplissage de la cuve.

CONCLUSIONS

Les essais entrepris au cours de ce travail montrent pour la levure une action de croissance anaérobie très nette de l'acide oléanolique, seul ou associé à l'acide oléique.

Cet acide oxytriterpénique, constituant essentiel de la cire cuticulaire du grain de raisin, peut donc se substituer à l'ergostérol pour favoriser le développement de la levure à l'abri de l'air.

Reçu pour publication en mars 1971.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mlle J. TROESTLER, du Service de Biochimie des Antigènes de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu nous aider dans les opérations préliminaires d'isolement de l'acide oléanolique.

SUMMARY

OLEANOLIC ACID AS A GROWTH FACTOR FOR WINE YEAST IN ANAEROBIOSIS

The wax which covers the grapes contains a factor increasing the anaerobic growth of yeasts. The main constituent extracted by chloroform from fresh grapes is oleanolic acid, an oxiterpenic acid. It crystallizes from hot alcohol and can be purified by preparative thin layer chromatography. Whether in the presence of oleic acid or not, the action of this product has been compared with that of ergosterol. Anaerobic cultures of *S. cerevisiae* produce more growth and ferment more sugar in presence of oleanolic acid than in presence of ergosterol, which has been reported as a growth factor by ANDREASEN and STIER (1954).

This finding can explain why an abundant growth of yeasts occurs even when the grapes are placed in anaerobic conditions from the start of the wine making process.

RESUMEN

EL ACIDO OLEANOLICO, FACTOR DE CRECIMIENTO ANAEROBIO DE LA LEVADURA DEL VINO

El polvillo que recubre las bayas de uvas contiene un factor que aumenta crecimiento anaerobio de las levaduras. El elemento componente más abundante extraido de las uvas frescas por el cloroformo es un producto oxiterpénico, es decir : el ácido oleanólico. Este último cristaliza a partir de soluciones en el alcohol caliente y puede ser purificado por cromatografia preparativa en capa fina. Su acción ha sido comparada con aquella del ergosterol, en presencia o en ausencia de ácido oléico. *S. cerevisiae* cultivado en aerobiosis crece con mayor rapidez y fermenta más azúcar en un medio que contenga ácido oleanólico, cuando se procede a establecer una comparación con los resultados obtenidos en presencia de ergosterol, el cual ha sido reconocido como un factor de crecimiento por ANDREASEN y STIER (1954).

Este resultado permite explicar por qué se produce una multiplicación importante de las levaduras, incluso en el caso de que la uva se encuentre en anaerobiosis a partir del momento de su introducción en cuba.

RIASSUNTO

ACIDO OLEANOLICO, FATTORE DI CRESCITA ANAEROBICA DEL LIEVITO DI VINO

La pruina che ricopre le bacche dell'uva contiene un elemento che aumenta la crescita anaerobica dei lieviti. Il più abbondante costituente astratto dall'uva fresca mediante il cloroformio, è un prodotto ossiterpenico, l'acido oleanolico.

Esso cristallizza a partire de soluzioni nell'alcool caldo e puo' essere purificato per cromatografia preparativa in strato sottile. La sua axione è stata paragonata a quella dell'ergosterolo in presenza e in assenza di acido oleico. *S. cerevisiae* coltivato in aerobiosi cresce più rapidamente e fermenta più zucchero in un ambiente contenente dell'acido oleanolico, se si fa il confronto con i risultati ottenuti in presenza d'ergosterolo, che è stato riconosciuto come un fattore di crescita da ANDREASEN e STIER (1954).

Questo risultato puo' spiegare perchè si produce una grande moltiplicazione dei lieviti, anche nel caso in cui l'uva è posta in anaerobiosi súbito dópo la messa in timo.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDREASEN A. A., STIER T. B. J., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. cell. comp. physiol.*, **41**, 23-36. *Ibidem*, 1954, **43**, 271-281.

BRÉCHOT P., CHAUVET J., CROSON Mme M., IRRMANN R., 1966. Extrait de pruine de raisin, facteur de croissance anaérobie de la levure cultivée sur moût de raisin. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 1004-1006.

HALVORSON H. O., BOCK R. M., TAURO P., EPSTEIN R., LA BERGE M., 1966. in *Cell synchronyc studies in Biosynthetic Regulation*. 102. Edit. Cameron I. L. and Padilla G. M. (New York), Ac. Press Inc.

MAUGENET J., DUPUY P., 1964. Synthèse des stérols par la levure. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 329-354.

PERLMAN D., 1967. Microbial technology steroid transformations. in *Microbial Technology*, 288-297. Edit. Peppler H. J., Reinhold publishing corporation, N. Y., Amsterdam, London.

RADLER F., 1965. The main constituents of the surface waxes of variety and species of the genus *Vitis*. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **16**, 159-167.

RADLER F., 1968. La cire cuticulaire des grains de raisin et des feuilles de la vigne. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **2**, 271-294 et Der Wachsüberzug der Weinbeeren und seine Zusammensetzung. *Die Weinwissenschaft*, **23**, 295-308.

RADLER F., 1969. Communication personnelle.

SLONIMSKY P., 1953. La formation des enzymes respiratoires chez la levure. *Actualités biochimiques*, n° 17, 9. Masson, Paris.

SOMOGYI M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, **160**, 61-68.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 111-119.

LE DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE DANS LES JUS DE RAISINS ET LES VINS

Suzanne LAFON-LAFOURCADE [1]

Institut d'Œnologie de Bordeaux, I. N. R. A.,
351, Cours de la Libération
33 - Talence

RÉSUMÉ

L'acide glutamique a été dosé dans les jus de raisins et les vins par la méthode enzymatique due à BERNT et BERGMEYER (1963) qui repose sur l'oxydation de l'acide glutamique en acide α-cétoglutarique. La réaction s'effectue à pH 9 en présence d'un excès de nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate (NAD) et est catalysée par la déshydrogénase glutamique (GLDH). Elle est suivie au spectrophotomètre par l'augmentation de densité optique due à la formation de NADH à 340 nm.

L'application au vin de cette méthode présente un certain nombre de difficultés dues à la coloration des vins rouges et à la présence d'anhydride sulfureux, notamment dans les vins blancs doux.

La décoloration des vins rouges par le charbon activé (10 à 20 g/litre) et l'élimination de l'anhydride sulfureux par évaporation à chaud dans les vins blancs jusqu'à l'obtention de teneurs inférieures à 50 mg/litre en anhydride sulfureux, permettent de réaliser le dosage dans les vins.

L'acide glutamique peut être estimé par voie enzymatique avec rapidité, spécificité et une précision chiffrée par un écart type p. 100 de 2,4 à 6,6.

Mots clés : *dosage enzymatique, acide glutamique, jus de raisin, vins.*

INTRODUCTION

L'étude physiologique des bactéries lactiques des vins a montré le rôle essentiel de l'acide glutamique dans la nutrition azotée de ces microorganismes (PEYNAUD *et al.*, 1965 ; BIDAN, 1966). Cet acide aminé est généralement présent dans les jus de raisins et les vins. Les teneurs dans ces milieux ont été fixées par des méthodes microbiologiques (CASTOR, 1953 ; CASTOR et ARCHER, 1956 ; LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, 1959 ; LAFON-LAFOURCADE et GUIMBERTEAU, 1962 ; FLANZY *et al.*, 1964 ; POUX *et al.*, 1964 ; POUX, 1968) ou chromatographiques (DIMOTAKIS, 1955 ; CARLES

[1] Département de Technologie végétale, I. N. R. A.

et al., 1958 ; TERCELJ, 1965). Plus récemment, POUX et OURNAC (1970) ont déterminé l'acide glutamique dans des vins par chromatographie automatique sur résine et, comparativement, par méthode microbiologique. Les auteurs ont noté des « différences considérables » entre les résultats obtenus par les deux méthodes.

Nous avons essayé de doser l'acide glutamique par voie enzymatique dans le but d'apporter à sa détermination la rapidité, la spécificité et la précision caractéristiques de ces méthodes.

MÉTHODE DE BERNT ET BERGMEYER

Principe

La méthode est due à BERNT et BERGMEYER (1963). Elle est basée sur le fait que la déshydrogénase glutamique (GLDH), en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate (NAD), catalyse la réaction :

$$\text{L-glutamate} + NAD^+ + H_2O \rightleftarrows \alpha\text{-cétoglutarate} + NADH + NH_4^+$$

Pour que la réaction soit complète, il faut opérer en milieu alcalin (pH = 9) en présence d'un grand excès de NAD et en bloquant l'α-cétoglutarate au fur et à mesure de sa formation par l'hydrazine.

La réaction est suivie au spectrophotomètre par l'augmentation de densité optique due à la formation de NADH, à 340 nm.

Réactifs

1° solution tampon à pH = 9 : pour 100 ml : 5,62 g de glycocolle ; 8,2 g d'hydrate d'hydrazine en solution à 24 p. 100 (Merck). Ajuster à pH = 9 avec de l'hydroxyde de sodium ;

2° solution de NAD : 100 mg de NAD dans 5 ml d'eau distillée ;

3° solution de GLDH (Sigma) à 10 mg de protéine par ml en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium.

Mode opératoire

On opère directement dans les cuves du spectrophotomètre. On détermine la différence de densité optique avant et après l'addition de GLDH dans les cuves contenant l'échantillon à doser et dans une cuve ne contenant que les réactifs (essai à blanc). Dans chacune des cuves, on ajoute les réactifs suivants :

	Essai à blanc	Échantillon à doser
Tampon	2 ml	2 ml
Eau	0,2 ml	0 ml
Vin ou jus de raisins	0 ml	0,2 ml
NAD	0,2 ml	0,2 ml
Densité optique initiale	D_i^b	D_i^e
Addition d'enzyme	0,02 ml	0,02 ml
Densité optique après 30 mn	D_f^b	D_f^e

On doit veiller à ce que le temps soit exactement identique pour chaque cuve entre l'addition de NAD et la mesure de la densité optique finale.

Calculs

La concentration en acide glutamique est donnée, selon la loi de LAMBERT-BEER par :

$$C = \frac{\Delta D \times M}{\varepsilon \times e}$$

où :

C = concentration en acide glutamique en g/ml ;
ΔD = augmentation de la densité optique due à l'oxydation de l'acide glutamique
$= (D_f^e - D_i^e) - (D_f^b - D_i^e)$;

M = masse moléculaire = 147 g ;
ε = coefficient molaire d'extinction à 340 nm = $6{,}22 \times 10^6$ cm²/mol. ;
e = épaisseur de la cuve = 1 cm.

Il vient :

$$C = \Delta D \times 147 \times \frac{1}{6{,}22} \times 10^{-6}.$$

Compte tenu de la dilution (0,2 ml de prise pour un volume final égal à 2,42 ml), on a finalement :

$$C \text{ mg/l} = \Delta D \times 147 \times \frac{1}{6{,}22} \times \frac{2{,}42}{0{,}2} \times 10^{-6} \times 10^{6}$$

ou

$$C \text{ mg/l} = 286 \times \Delta D.$$

Cette méthode permet le dosage de l'acide glutamique en solution simple avec une reproductibilité des résultats que l'on peut chiffrer par un écart-type de 3,5 p. 100.

CAUSES D'ERREURS OU D'INTERFÉRENCES

A. — *La couleur des vins*

Les teneurs des vins en acide glutamique sont telles qu'on est parfois obligé d'employer des prises d'essai qui peuvent atteindre jusqu'à 8,4 p. 100 du volume réactionnel. Dans le cas des vins rouges, l'absorption due à la couleur du vin est alors très élevée et diminue la sensibilité du dosage. En outre, dans les conditions du dosage (pH = 9, durée 30 minutes) l'oxydation des tanins du vin provoque une variation d'absorption négative, non négligeable. Cette cause d'erreur est écartée lorsque les vins sont décolorés (fig. 1). Plusieurs techniques de décoloration des vins ont été essayées.

1. Décoloration au charbon activé. On met en suspension 10, 20, 40 g de charbon activé par litre de vin et on filtre.

2. Décoloration à l'acétate de plomb : 100 ml de vin sont neutralisés par addition de carbonate de calcium. On ajoute alors 5 ml de sous-acétate de plomb et 5 ml de sulfate de sodium en solution saturée. On laisse reposer 10 minutes entre chaque addition et on filtre.

3. Décoloration à l'acétate mercurique : 50 ml de vin sont introduits dans un ballon jaugé de 100 ml avec 10 à 20 ml de réactif de LABORDE (acétate mercurique 2,5 g p. 100, acétate d'ammonium 10 g p. 100, dans l'eau). On attend 15 minutes en agitant de temps en temps le mélange. On ajoute alors 2 g de poudre de zinc. Après 30 minutes, on homogénéise et on filtre.

Pour réaliser ces essais, nous avons enrichi un vin rouge en acide glutamique

afin que les prises d'essai nécessaires soient faibles (0,8 p. 100 du volume contenu dans la cuve), donc l'absorption initiale peu élevée, ce qui rend le dosage possible sans traitement préalable du vin.

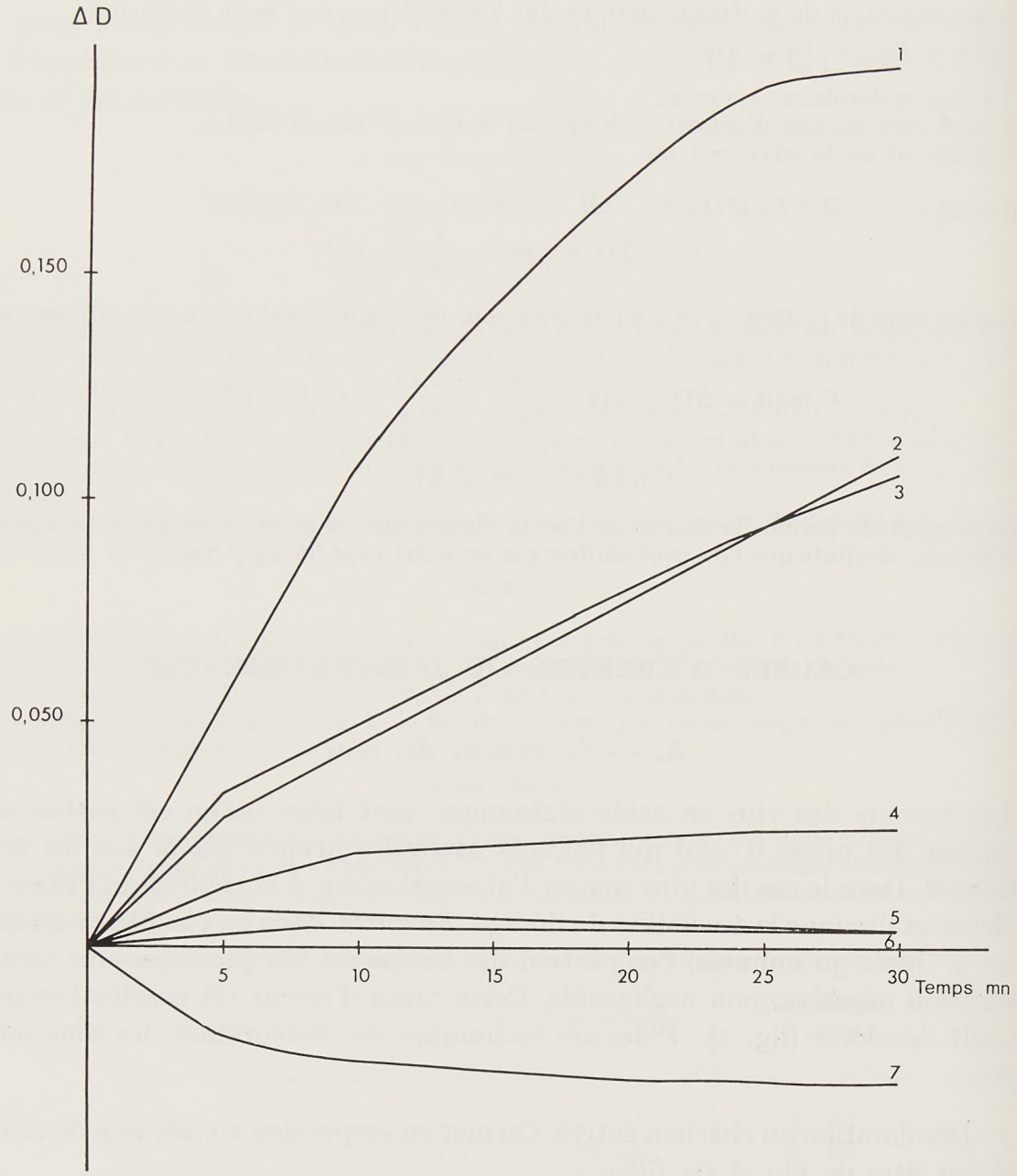


FIG. 1. — *Réaction enzymatique du dosage de l'acide glutamique. Variation de ΔD en fonction du temps pour différents mélanges*

1. Vin décoloré + enzyme (dosage de l'acide glutamique dans un vin)
2. Vin décoloré + enzyme + SO_2 (dosage de l'acide glutamique dans un vin en présence de SO_2)
3. Vin décoloré + double dose d'enzyme + SO_2
4. Tampon + enzyme (essai à blanc)
5. Vin rouge décoloré sans enzyme
6. Tampon + enzyme + SO_2 (essai à blanc en présence de SO_2)
7. Vin rouge sans enzyme

ΔD à retenir pour la détermination de l'acide glutamique est la différence entre les ordonnées des courbes 1 et 4 au temps 30 mn.

La valeur moyenne de l'acide glutamique dans ce vin est de 247 mg/litre. L'écart extrême est de — 10, l'écart-type ± 6, l'écart p. 100 : 2,4.

Le tableau 1 résume l'influence des divers traitements de décoloration.

On voit que les traitements à l'acétate de plomb et à l'acétate mercurique entraînent des déficits de dosage conséquents.

Le traitement au charbon, le plus rapide, est aussi le plus convenable, du moins à des doses inférieures à 20 g/litre, puisque les résultats obtenus se situent dans les limites de précision du dosage.

TABLEAU 1

Influence des traitements de décoloration des vins sur le dosage de l'acide glutamique

Traitement	Acide glutamique valeur moyenne (mg/l)	Erreur p. 100
Témoin	247	
Charbon 10 g/l	241	— 2,4
Charbon 20 g/l	243	— 1,6
Charbon 40 g/l	232	— 6
Acétate de plomb	216	— 12,5
Acétate mercurique	198	— 23,8

B. — *L'anhydride sulfureux*

Les jus de raisins et les vins, notamment les vins blancs doux, contiennent souvent des quantités importantes d'anhydride sulfureux. Une combinaison entre NAD et ce corps, accompagnée d'une diminution d'activité du coenzyme, a été signalée par Dupuy (1959). Le dosage de l'acide glutamique s'effectuant à un pH élevé (pH = 9), l'anhydride sulfureux combiné dans les vins se trouve en grande partie sous forme libre dans la cuve de dosage.

TABLEAU 2

Dosage de l'acide glutamique en solution simple en présence d'anhydride sulfureux

Solution à 94 mg/l. Toutes les concentrations sont exprimées en mg/l

SO_2 libre	SO_2 combiné à l'acétaldéhyde	Acide glutamique trouvé par dosage	Erreur p. 100
500	0	52	— 47
100	0	79	— 16
75	0	91	— 3
50	0	92	— 2
0	300	57	— 39
0	100	83	— 11
0	75	90	— 4
0	50	96	+ 2

1. Influence de l'anhydride sulfureux libre et combiné à l'acétaldéhyde sur la précision du dosage de l'acide glutamique en solution simple : les résultats sont consignés dans le tableau 2.

On voit que les taux d'anhydride sulfureux total dans les solutions soumises au dosage ne doivent pas excéder 50 mg/litre.

Le tableau 3 donne les résultats trouvés et les caractères statistiques pour des solutions simples dans le cas de teneurs en anhydride sulfureux total compatibles avec le dosage.

La figure 1 présente les courbes de variation des différences de densité optique ΔD en fonction du temps, pour différents mélanges.

Lorsqu'on ajoute de l'anhydride sulfureux (300 mg/litre) au mélange solution tampon-enzyme (essai à blanc), l'absorption initiale augmente de 40 p. 100, mais les variations de densité optique sont très nettement diminuées.

De même, lorsqu'on enrichit un vin rouge décoloré en anhydride sulfureux (300 mg/litre), son absorption initiale s'élève de 40 p. 100 environ et l'oxydation enzymatique de l'acide glutamique s'effectue à une vitesse très ralentie, vitesse que ne peut augmenter le doublement de la concentration initiale en NAD. L'absorption initiale croît très rapidement avec l'augmentation des concentrations en NAD en présence d'anhydride sulfureux. On est donc rapidement limité dans les quantités de coenzyme qu'il est possible de mettre en œuvre.

2. Dosage de l'acide glutamique dans les vins sulfités. Ces vins doivent être préalablement traités pour réduire leurs teneurs en anhydride sulfureux à des taux voisins de 50 mg/litre. Ce résultat est obtenu par évaporation au bain-marie. Des concentrations de moitié, parfois même au quart de leur volume, sont nécessaires.

TABLEAU 3

Reproductibilité des dosages d'acide glutamique en solutions simples

Teneurs en mg/l

Acide glutamique dans les solutions à doser	SO_2		Acide glutamique dosé		Écart type	Écart type p. 100
	Libre	Combiné à l'acétaldéhyde	Valeur moyenne	Extrême		
Préparation n° 1 : 100	0	0	96	— 7	3,5	3,6
Préparation n° 2 : 94	75	0	91	— 6	5,5	5,8
	50	0	92	— 6	4,6	4,9
	0	75	90	— 10	8	8,5
	0	50	96	+ 4	4	4,2

Nous avons dosé l'acide glutamique dans trois préparations des vins A et B (tabl. 4) correspondant à des évaporations plus ou moins poussées des liquides réduisant leurs teneurs en anhydride sulfureux total. Les concentrations en acide glutamique, dans les préparations dont les taux en anhydride sulfureux total sont inférieurs à 50 mg/litre, sont respectivement de 28 et 18 mg/litre.

Ces deux vins sont ensuite supplémentés en acide glutamique de manière à porter leurs teneurs respectives à 113 et 103 mg d'acide glutamique par litre et sont soumis au même traitement que précédemment.

Le tableau 4 montre que l'inhibition de la réaction enzymatique du dosage de l'acide glutamique peut être encore de 14 p. 100 dans un vin ayant 76 mg/litre d'anhydride sulfureux.

Dans le vin B, ramené à 40 mg/litre en anhydride sulfureux, le dosage de l'acide glutamique a été réalisé avec un écart type de 6,6 p. 100.

TABLEAU 4

Dosage de l'acide glutamique dans deux vins sulfités

Teneurs en mg/l

VIN A				VIN B			
SO_2 total	Acide glutamique dosé	Vin supplémenté (113 mg/l) Ac. glutamique dosé	Erreur p. 100	SO_2 total	Acide glutamique dosé	Vin supplémenté (103 mg/l) Ac. glutamique dosé	Erreur p. 100
312	23	57	— 49	320	10	52	— 49
76	25	96	— 14	96	11	68	— 34
45	28	106	— 6	40	18	106	+ 3

COMPARAISON DES VALEURS D'ACIDE GLUTAMIQUE OBTENUES PAR LES MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUE, ENZYMATIQUE ET MICROBIOLOGIQUE.

Nous devons à l'obligeance de M. Poux d'avoir pu comparer ces trois méthodes dans quatre vins rouges dans lesquels l'acide glutamique avait été dosé par chromatographie sur colonne à la Station d'Œnologie et de Technologie végétale de Narbonne.

Les résultats sont consignés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Comparaison des résultats obtenus pour le dosage de l'acide glutamique selon trois méthodes différentes

Les teneurs sont en mg/l

Vins	Méthode chromatographique	Méthode enzymatique	Méthode microbiologique
n° 1	48,7	45,8	70
n° 2	12,9	10,9	30
n° 3	30,7	26,3	39
n° 4	13,1	11,4	26

La méthode enzymatique donne des résultats plus faibles, mais très proches de ceux obtenus par la méthode chromatographique. Pour des teneurs de l'ordre de 50 mg/litre, l'écart est de 6 p. 100.

Par contre, les valeurs obtenues par la méthode microbiologique sont considérablement plus élevées. Cette méthode dose très certainement un « complexe acide glutamique » agissant comme facteur de croissance vis-à-vis de l'organisme-test *Leuconostoc mesenteroides* qui utilise vraisemblablement l'acide glutamique engagé dans les macro-molécules polypeptidiques.

Reçu pour publication en avril 1971.

SUMMARY

ENZYMATIC DOSAGE OF GLUTAMIC ACID IN GRAPES AND WINES

L-glutamic acid is determined in musts and wines by enzymatic method described by BERNT and BERGMEYER (1963). The L-glutamic acid can be quantitatively oxidized to α-oxoglutarate, with a large excess of NAD and alkaline medium (pH 9), catalyzed by GLDH. The increase of optical density due to the formation of NADH is mesured at 340 nm with the aid of spectrophotometer.

This method applied to wines is inconvenient because of coloration in red wines, and sulfurous dioxyde concentration especially in sweet white wines.

Decoloration of red wines with active coal (10-20 g/l) and decreasing of sulfurous dioxyde to 50 mg/l by boiling white wines, allow carry out enzymatic analysis on wines.

L-glutamic acid can be determined rapidly, specifically and exactly by enzymatic method (standard deviation : 2,4 to 6,6 p. 100).

RESUMEN

LA DOSIFICACIÓN ENZIMATICA DEL ACIDO GLUTAMICO EN LOS ZUMOS DE UVAS Y LOS VINOS

El método enzimático debido a BERNT y BERGMEYER (1963) ha para la dosificación del ácido glutámico en los zumos de uvas y en los vinos, método que se funda en la oxidación del ácido glutámico en ácido α-cetoglutárico. La reacción se efectúa con un pH 9 en presencia de un exceso de nicotinamida-adenina-dinocleótico fosfato (NAD) y su catalización tiene lugar por la deshidrogenada glutámica (GLDH). Dicha reacción queda seguida al espectrómetro por aumento de densidad óptica debida a la formación de NADH a 340 nm.

La aplicación de este método presenta cierto número de dificultades en el caso del vino, que se deben a la coloración de los vinos tintos y a la presencia de anhídrido sulfuroso, en particular en los vinos blancos dulces.

La decoloración de los vinos tintos por el carbón activado (10 a 20 g/litro) y la eliminación del anhídrido sulfuroso por evaporación en caliente en los vinos blancos hasta la obtención de contenidos inferiores a 50 mg/litro en anhídrido sulfuroso, permiten realizar la dosificación en los vinos.

El ácido glutámico puede ser estimado por vía enzimática con suma rapidez, especifidad y una precisión cifrada por una diferencia tipo p. 100 de 2,4 a 6,6.

RIASSUNTO

IL DOSAGGIO ENZIMATICO DELL'ACIDO GLUTAMMICO NEI SUCCHI D'UVA E NEI VINI

Mediante il metodo enzimatico dovuto a BERNT e BERGMEYER (1963), è stato dosato l'acido glutammico nei succhi d'uva e nei vini. Tale metodo si basa sull'ossidazione dell'acido glutammico in acido α-cetoglutarico. La reazione avviene a pH 9 in presenza di un eccesso di nicotinamida-

adenina-dinucleotide fosfato (NAD) ed è catalizzata dalla desidrogenasi glutammica (GLDH). Essa viene seguita allo spettrofotometro grazie all'aumento di densità ottica dovuta alla formazione di NADH a 340 nm.

L'applicazione di questo metodo sul vino presenta un certo numero di difficoltà dovute alla colorazione dei vini rossi e alla presenza di anidride solforosa, specialmente nei vini bianchi dolci.

La decolorazione dei vini rossi mediante il carbone attivato (da 10 a 20 g/litro) e l'eliminazione dell'anidride solforosa mediante l'evaporazione a caldo nei vini bianchi fino ad ottenere dei tenori in anidride solforosa inferiori a 50 mg/litro, consentono di realizzare il dosaggio nei vini.

L'acido glutammico si puo' valutare per via enzimatica con rapidità, specificità e una precisione stimata con uno scarto tipo p. 100 da 2,4 a 6,6.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGMEYER A. V., 1963. *Methods of enzymatic analysis.* Academic Press.

CARLES J., LAMAZOU-BETBEDER M., PECH R., 1958. Les acides aminés libres du vin. *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 1254.

CASTOR J. G. B., 1953. The free amino acids of must and wines. *Food Res.*, **18**, 139-146.

CASTOR J. G. B., ARCHER T. E., 1956. Amino acids in must and wines. Proline, serine and threonine. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **7**, 19.

DUPUY P., 1959. L'inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 233-283.

Difco Manual, 1953. Detroit, Michigan.

DIMOTAKIS P. N., 1955. Acides aminés libres dans les vins grecs (en grec). *Chim. Chron.*, 20.

FLANZY C., POUX C., FLANZY, M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins ; protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13** (3), 283-300.

FLANZY C., POUX C., 1965. Note sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année (maturation et fermentation). *Ann. Technol. agric.*, **14** (1), 87-91.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1959. Dosage microbiologique des acides aminés des moûts de raisins et des vins. *Vitis*, (2), 53.

LAFON-LAFOURCADE S., GUIMBERTEAU G., 1962. Évolution des aminoacides au cours de la maturation des raisins. *Vitis*, (3), 130-135.

POUX C.,FLANZY C., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins ; protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13** (1), 5-18.

POUX C., 1968. Composés azotés dans les vins de goutte, vins de presse et vins de lies. *Ann. Technol. agric.*, **17** (4), 315-332.

POUX C., OURNAC Andrée, 1970. Acides aminés libres et polypeptidiques du vin. *Ann. Technol. agric.*, **19** (3), 217-237.

TERCELJ D., 1965. Études des composés azotés du vin. *Ann. Technol. agric.*, **14** (4), 307-309.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 121-130.

ÉTUDE SUR LA QUALITÉ DES AMANDES *AMYGDALUS COMMUNIS* L. : VARIABILITÉ DE QUELQUES CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

M. SOUTY, P. ANDRÉ, Liliane BREUILS et G. JACQUEMIN

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84 - Montfavet

RÉSUMÉ

La culture de l'Amandier présente en France, et dans de nombreux autres pays, notamment du Bassin méditerranéen, un développement nouveau. Les résultats de la sélection variétale permettent un choix étendu de variétés et nous avons étudié quelques caractères biochimiques des principales d'entre elles cultivées en France.

Les teneurs en huile varient de 51 à 61,6 p. 100, celles de l'azote total de 3,9 à 5,1 p. 100, pour des amandons mondés. Les éléments minéraux varient également dans des proportions assez importantes. Nous remarquons la richesse de ces fruits en Mn, la variété *Nec plus Ultra* atteignant 4,1 mg de Mn p. 100 g de poudre non déshuilée.

Les rendements au cassage et au mondage ont également été étudiés et discutés.

Une brève revue de la littérature concernant la valeur nutritive de ces graines en général est rapportée, et si, de par certains constituants (éléments minéraux), ces fruits sont intéressants du point de vue alimentaire, leur pauvreté en certains acides aminés essentiels nécessite, pour un régime complet, de les associer notamment avec de la caséine.

La connaissance de la variabilité de la composition chimique des fruits des différentes variétés doit permettre de mieux adapter la production à l'utilisation.

Mots clés : *Composition chimique, qualité, variétés, amandes.*

INTRODUCTION

L'Amandier est, avec le Figuier et l'Olivier, un arbre caractéristique des paysages provençaux : longtemps cultivé sans soins particuliers sur des sols des plus médiocres, il est actuellement l'objet d'un attrait certain et sa culture connaît un renouveau. Les difficultés rencontrées sur le marché des pommes et des pêches conduisent les producteurs de fruits à envisager l'établissement de vergers avec des espèces dont la production nationale est déficitaire, et l'on songe à l'Amandier dont la production annuelle oscille entre 500 et 1 500 tonnes d'amandons (fruits secs sans coques) alors que les besoins approchent 15 000 tonnes dont 30 p. 100 sont absorbés par l'industrie (THIAULT, 1969). L'avenir apparaît donc prometteur pour le développement de cette culture, et en particulier en Provence.

La sélection variétale entreprise dès 1951 à la Station de Recherches d'Arboriculture fruitière de la Grande-Ferrade par J. SOUTY et ses collaborateurs, et opérée parmi plus de 600 introductions de toutes provenances, permet déjà un choix de variétés adaptées au climat français. Un programme d'hybridations mis en route en 1960 pour pallier les insuffisances de la sélection aboutit déjà à l'obtention de nouvelles variétés bien adaptées aux climats et aux sols de nos régions (GRASSELLY, 1969). Tenant compte des résultats déjà obtenus et des techniques éprouvées dans d'autres pays, le Comité national interprofessionnel de l'Amande favorise le développement de nouvelles plantations.

Devant l'hétérogénéité du matériel constituant les variétés, et étant donné la nécessité d'adapter la « qualité » des fruits — qualité nutritive, qualité technologique (facilité de travail, minimum de déchets) — aux besoins des utilisateurs, l'étude de la composition chimique des diverses variétés apparaît indispensable. L'Amande est en effet consommée soit verte (utilisation non envisagée dans cette étude), soit sèche en coques (consommation de table), soit sèche sans coque (pâtisserie familiale ou industrie) : les exigences des industriels varient alors en fonction des utilisations envisagées (BERGER, 1969).

Le présent travail rapporte la variabilité de quelques caractères biochimiques des fruits des variétés inscrites, en juillet 1969, au Catalogue officiel des Espèces et Variétés cultivées en France, et provenant d'un même verger d'étude, ainsi que quelques variétés de provenances diverses. La description des caractères morphologiques et physiologiques de ces variétés a été faite par GRASSELLY (1969) et GRASSELLY, GALL et LÉGLISE (1969).

ÉTUDES RÉALISÉES ET MÉTHODES

Les treize variétés inscrites au Catalogue et analysées ont été récoltées dans le verger du Domaine expérimental d'Arboriculture fruitière de la Grande-Ferrade à Manduel (Gard) où sont rassemblées, pour un essai de comportement, les diverses introductions. Les variations constatées dans la composition chimique des fruits ne sont donc que variétales, puisque sol, climat et techniques culturales sont identiques pour toutes. Nous présenterons indépendamment des autres les résultats concernant les variétés provenant d'autres vergers.

Les déterminations analytiques ont été faites quatre mois après la récolte sur un échantillon réalisé à partir de deux cents amandes écalées et séchées après cueillette dans des conditions standard (GALL, 1969). Au laboratoire, les coques ont été cassées manuellement et les amandons mondés par échaudage. Ils ont ensuite été desséchés une nuit à l'étuve avant pulvérisation.

La teneur en huile a été déterminée par extraction à l'éther de pétrole au moyen d'un appareil de Soxhlet.

L'azote total a été obtenu après minéralisation selon la méthode Kjeldahl.

Les éléments minéraux majeurs et les oligo-éléments ont été dosés par fluorescence X (Nicole SOUTY et GUENNELON, 1967 et 1968) au moyen d'un appareil de marque Siemens, sur la poudre préalablement déshuilée.

RÉSULTATS

Le tableau 1 indique les variétés retenues dans cette étude et provenant du verger expérimental de Manduel, avec indication de leur origine et de leur position dans les classes d'inscription du Catalogue.

Les variétés de la classe 1 sont des variétés d'intérêt cultural et commercial recommandées pour la production fruitière française.

Les variétés de la classe 2 sont des variétés locales, régionales, ou d'amateurs.

Les variétés de la Rubrique Particulière (R. P.) sont des variétés en cours d'expérimentation.

TABLEAU I

Variétés d'amandiers inscrites au Catalogue en 1969

Variétés	Origine	Classe d'inscription au Catalogue
Aï	Bouches-du-Rhône (France)	1
Ardéchoise	Ardèche (France)	2
Desmayo Largueta	Espagne	RP
Drake	Californie (U. S. A.)	RP
Ferraduel	I. N. R. A. (France)	RP
Ferragnès	I. N. R. A. (France)	RP
Flour en bas	Alpes de Hte-Prov. (France)	2
Fourcouronne	Alpes de Hte-Prov. (France)	1
Fournat de Brezenaud	Alpes-Maritimes (France)	RP
Marcona	Espagne	1
Nec plus Ultra	Californie (U. S. A.)	RP
Princesse 103		2
Texas	Californie (U. S. A.)	RP

La liste des variétés ainsi inscrites dans les différentes rubriques n'est jamais définitive et est en continuelle évolution ; ainsi, *Flour en Bas* et *Fourcouronne* seront prochainement supprimées.

Le tableau 2 donne pour les variétés récoltées à Manduel la variabilité des poids moyens des amandes en coque et des amandons naturels et mondés déterminés au laboratoire. Ces déterminations permettent de définir un rendement au mondage.

TABLEAU 2

Caractères morphologiques des fruits des principales variétés d'amandiers récoltées à Manduel en 1969

Variétés	Poids moyens (g)			Rendement au cassage (p. 100)	Rendement au mondage (p. 100)
	Amande en coque	Amandon naturel	Amandon mondé		
Aï	3,91	1,67	1,59	43	95
Ardéchoise	2,41	1,47	1,40	61	95
Desmayo Largueta	4,93	1,37	1,23	28	90
Drake	3,31	1,57	1,43	47	91
Ferraduel	5,24	1,37	1,29	26	94
Ferragnes	4,65	1,88	1,72	40	91
Flour en Bas	6,58	1,36	1,30	21	96
Fourcouronne	5,22	1,48	1,41	28	95
Fournat de Brezenaud	3,75	2,04	1,91	54	94
Marcona	5,90	1,54	1,45	26	94
Nec plus Ultra	3,10	1,77	1,68	57	95
Princesse 103	3,85	2,05	1,90	53	93
Texas	3,25	1,71	1,57	53	92

Plus la coque est tendre, plus le rendement au cassage est élevé, et dans les variétés étudiées ce rendement passe de 21 p. 100 pour une coque très dure (*Flour en Bas*) à 61 p. 100 pour une coque très tendre (*Ardéchoise*). Le rendement au mondage indique la quantité de peau enlevée au cours de l'opération correspondante. Ces rendements varient de 90 à 96 p. 100.

Les teneurs en huile, en azote total et en cendres sont rapportées dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Teneurs en huile, en azote et en cendres de variétés récoltées en 1969

Variétés	Teneur en huile	Azote total	Protéines (N × 6,25)	Cendres	
				Poudre déshuilée	Poudre non déshuilée
1. *Aï*	54,4	5,1	31,9	7,96	3,63
2. *Ardéchoise*	61,6	3,9	24,4	7,53	2,89
3. *Desmayo Largueta*	57,7	4,3	26,9	8,05	3,41
4. *Drake*	—	4,6	28,8	—	—
5. *Ferraduel*	60,9	3,7	23,1	8,34	3,26
6. *Ferragnes*	55,2	4,0	25,0	7,80	3,49
7. *Flour en Bas*	52,2	4,6	28,8	7,69	3,68
8. *Fourcouronne*	54,1	4,6	28,8	7,85	3,60
9. *Fournat de Brezenaud*	54,4	4,4	27,5	7,71	3,52
10. *Marcona*	55,6	4,8	30,0	7,23	3,21
11. *Nec plus Ultra*	59,2	3,9	24,4	8,42	3,44
12. *Princesse 103*	51,8	4,1	25,6	6,88	3,32
13. *Texas*	55,1	4,7	29,4	7,10	3,19
Valeur moyenne	56,0	4,4	27,3	7,71	3,39
14. *Aï*	51,0	5,0	31,3	6,86	3,36
15. *Drake*	58,1	4,3	26,9	7,02	2,94
16. *Ferragnes*	58,4	4,2	26,3	8,63	3,59
17. *I. X. L.*	56,8	4,2	26,3	7,34	3,17
18. *Non Pareil*	55,0	3,9	24,4	6,86	3,08
19. *Texas*	55,1	4,5	28,1	7,17	3,21
20. *Thompson*	56,2	4,5	28,1	6,94	3,03
Valeur moyenne	55,8	4,4	27,3	7,26	3,20

Les analyses ont été faites sur la poudre obtenue à partir des amandons mondés et les résultats exprimés pour 100 g de poudre non déshuilée (sauf indication contraire).

1 à 13 : variétés récoltées à Manduel.

14 à 20 : variétés de provenances diverses.

Pour l'huile, nous constatons des valeurs allant de 51,8 à 61,6 p. 100 avec une valeur moyenne de 56 p. 100. Les teneurs en azote total varient de 3,7 à 5,1 p. 100 avec une valeur moyenne de 4,4 p. 100, ce qui, calculé à l'aide du coefficient 6,25, donne de 23,1 à 31,9 p. 100 de protéines. Nous avons rapporté également dans ce tableau la teneur en cendres de la poudre déshuilée, et calculée pour la poudre non déshuilée.

Dans le tableau 4 sont rassemblés les dosages des éléments minéraux majeurs et des oligo-éléments. Ces fruits sont riches en éléments minéraux. Les teneurs en Ca, K et P varient dans des proportions assez grandes ; celles en S et en oligo-éléments

TABLEAU 4

Dosage des principaux éléments minéraux de variétés récoltées en 1969

Variétés	Éléments majeurs					Oligo-éléments					Somme éléments minéraux
	Ca	K	P	S	E. M.	Fe	Cu	Mn	Zn	O. E.	
1. *Aï*	270	1 000	750	250	2 270	4,6	1,1	2,3	3,4	11,4	2 281,4
2. *Ardéchoise*	180	730	610	200	1 720	5,8	1,3	3,0	3,5	13,6	1 733,6
3. *Desmayo Largueta*	310	840	650	220	2 020	4,7	1,2	2,6	2,8	11,3	2 031,3
4. *Drake*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. *Ferraduel*	310	810	680	210	2 010	3,9	1,0	2,6	4,1	11,6	2 021,6
6. *Ferragnes*	350	840	660	220	2 070	4,2	0,9	2,5	3,5	11,1	2 081,1
7. *Flour en Bas*	200	1 160	700	210	2 270	4,4	1,1	2,3	3,5	11,3	2 281,3
8. *Fourcouronne*	220	860	740	220	2 040	4,9	1,2	2,5	3,6	12,2	2 052,2
9. *Fournat de Brezenaud*	210	990	630	190	2 020	4,5	1,2	2,5	3,3	11,5	2 031,5
10. *Marcona*	200	790	670	210	1 870	3,2	1,0	2,6	2,7	9,5	1 879,5
11. *Nec plus Ultra*	340	840	590	240	2 010	5,9	1,6	4,1	4,2	15,8	2 025,8
12. *Princesse 103*	330	790	610	220	1 950	5,2	1,2	2,5	3,1	12,0	1 962,0
13. *Texas*	320	780	610	210	1 920	4,8	1,0	3,0	2,3	11,1	1 931,1
Valeur moyenne	270	870	660	220	2 020	4,6	1,1	2,7	3,3	11,7	2 031,7
14. *Aï*	370	860	610	240	2 080	4,6	1,1	2,2	4,5	12,4	2 092,4
15. *Drake*	300	780	530	230	1 840	4,9	1,5	1,5	3,4	11,3	1 851,3
16. *Ferragnes*	380	840	700	250	2 170	4,2	0,9	2,6	3,7	11,4	2 181,4
17. *I. X. L.*	300	860	520	200	1 880	4,8	1,2	3,2	2,9	12,1	1 892,1
18. *Non Pareil*	350	870	460	190	1 870	5,9	1,4	2,5	4,4	14,2	1 884,2
19. *Texas*	310	790	600	220	1 920	3,9	1,0	2,6	2,4	9,9	1 929,9
20. *Thompson*	310	780	600	210	1 900	4,6	1,1	2,6	3,1	11,4	1 911,4
Valeur moyenne	330	830	570	220	1 950	4,7	1,2	2,5	3,5	11,9	1 961,9

Résultats exprimés en mg pour 100 g d'amandons non déshuilés.
1 à 13 : variétés récoltées à Manduel.
14 à 20 : variétés de provenances diverses.

TABLEAU 5

Composition en éléments minéraux des amandes sèches
(d'après RANDOIN, LE GALLIC et CAUSERET cités par ULRICH (1952))
Valeurs en mg dans 100 g de la partie comestible

Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
6	254	450	160	3	800	243	1,94	4	1	1,5

semblent plus constantes d'une variété à l'autre. Il faut cependant noter la richesse particulière de *Nec plus Ultra* en Mn : 4,1 mg pour 100 g de poudre, alors que la moyenne des variétés étudiées est de 2,7 mg pour 100 g ; c'est également la plus riche en Zn.

Dans le tableau 5 nous avons rapporté la composition en éléments minéraux des amandes sèches telle qu'elle est signalée dans la littérature (ULRICH, 1952).

DISCUSSION

Il n'est pas possible de définir une variété idéale d'amande, car, si on se base d'un point de vue uniquement technologique, celle-ci devra posséder des caractéristiques bien définies en fonction des usages envisagés : la fabrication des dragées de luxe réclame un amandon plat et allongé, alors que celle des amandes effilées et la chocolaterie préfèrent un amandon plus épais.

Le choix entre coque tendre et coque dure est assez difficile à préciser. Les coques tendres, préférées pour la consommation de table, attirent aussi les industriels obligés d'employer une main-d'œuvre chère (U. S. A., France), puisque, après le cassage, le triage des coques peut se faire mécaniquement et facilement ; mais la conservation de telles amandes est délicate. Par contre, si les amandes à coque dure se conservent bien, la séparation des coquilles cassées des amandons doit se faire manuellement et entraîne un prix de revient plus élevé. Il ne fait pas de doute cependant que les amandes à coque dure seraient certainement plus appréciées par les industriels si des progrès pouvaient être réalisés pour leur triage mécanique après cassage. Le choix variétal actuellement proposé semble de ce point de vue assez satisfaisant ; nous trouvons en effet cinq variétés à coque très dure (*Desmayo Larguetta, Ferraduel, Flour en Bas, Fourcouronne, Marcona*) dont les caractères biochimiques et notamment les teneurs en huile sont suffisamment différents, trois variétés à coque assez tendre (*Aï, Drake* et *Ferragnes*), les cinq autres étant des variétés à coque très tendre.

Le rendement au mondage préoccupe les industriels car la peau enlevée est un déchet inutilisable par ailleurs, et nous constatons que selon les cultivars ce déchet peut varier de 4 à 10 p. 100.

La teneur élevée en azote total serait un indice de qualité (valeur protéique), mais pour un nutritioniste l'apport minéral, souligné par l'importance des cendres, constitue le principal intérêt de ce fruit. Nous trouvons une bonne corrélation entre la somme de tous les éléments minéraux dosés et plus exactement la somme des principaux cations (éléments majeurs du tableau 4) et la teneur en cendres : en ne considérant que les fruits récoltés à Manduel (conditions identiques), nous avons dans les deux cas, pour $n = 12$, un coefficient de corrélation $r = 0{,}91$ (avec r limite $= 0{,}71$ pour une sécurité de 99 p. 100 ; LAMOTTE, 1957). Mais cette corrélation n'est pas vraie au niveau de tous les éléments : elle est encore significative si l'on considère la somme des cations potassium et phosphore ($r = 0{,}83$), ou le seul potassium ($r = 0{,}80$) ; elle n'est plus vraie au niveau des autres éléments : on est à la limite de la signification pour une sécurité de 95 p. 100 si l'on considère le phosphore seul ($r = 0{,}59$) et il n'y a pas de corrélation entre la teneur en calcium et la quantité des cendres. Potassium et phosphore représentent de 70 à 80 p. 100 des éléments

minéraux; il en résulte que la teneur en calcium n'est absolument pas liée au taux des autres éléments.

L'Amande est riche en calcium, mais on peut se demander dans quelle proportion ce calcium est absorbé, compte tenu de la richesse de cette graine en acide oxalique : 410 mg p. 100 g selon KOHMAN (1939).

L'apport de ces fruits en oligo-éléments est loin d'être négligeable, mais, comme le montre la deuxième partie du tableau 4, les proportions respectives des différents constituants minéraux varient assez fortement suivant les conditions de sol et de culture.

Les lipides sont des aliments énergétiques précieux. Une étude de la composition en acides gras de l'huile d'un grand nombre de cultivars de la région de Bari a été réalisée récemment (CARRANTE et CUCURACHI, 1966).

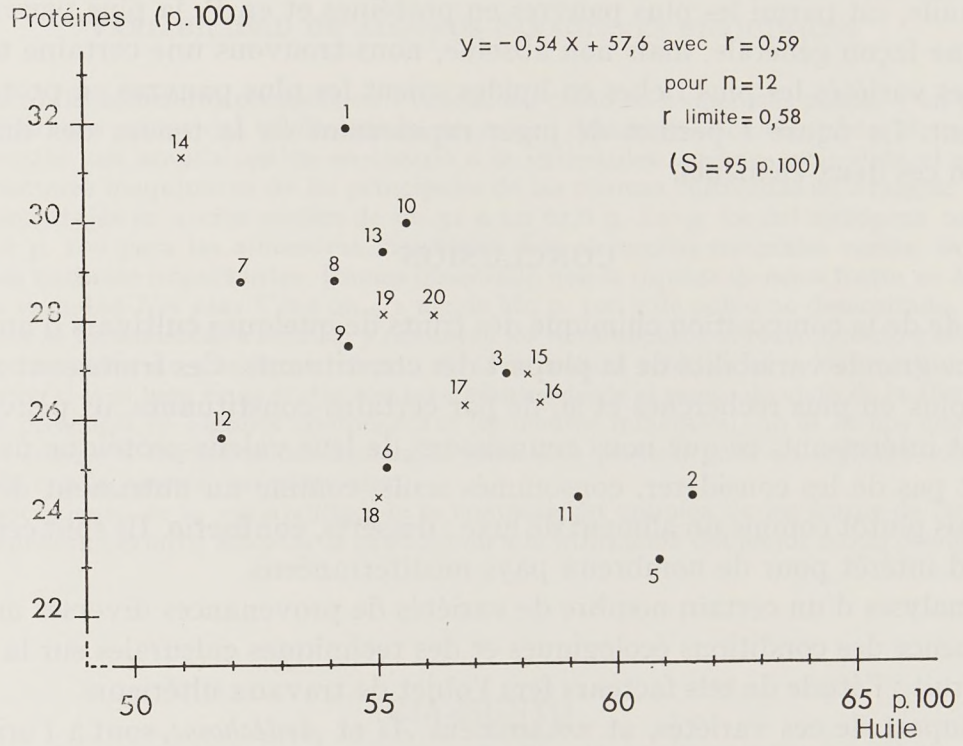


FIG. 1. — *Teneurs en huile et en protéines des variétés analysées en 1969*
(Pour la correspondance entre les numéros et les variétés, se rapporter au tableau 3)

La valeur protéique de ces fruits a fait l'objet de nombreuses investigations. MITCHELL et BEADLES (1937), cités par GIRARD *et al.* (1961), ont comparé les coefficients d'utilisation digestive (CUD) et la valeur biologique (VB) des protéines de la viande de bœuf et celles des amandes. Ils ont trouvé :

pour la viande de bœuf : CUD = 100 ; VB = 75,8
pour les amandes : CUD = 93,9 ; VB = 50,8

HALL *et al.* (1958) ont montré que certains traitements, tels que le grillage au four ou le rôtissage, altéraient fortement l'efficacité protéique (EP) de ces fruits pour la croissance, alors que le blanchiment utilisé pour éliminer la peau ne modifie sensiblement pas la teneur en éléments nutritifs. Une étude de la composition des protéines des amandes des Pouilles a été faite par STRUSI (1960). GIRARD *et al.*

trouvent une diminution de 17 p. 100 dans l'efficacité des protides pour la croissance lorsque les amandes sont torréfiées. D'après leurs observations, les amandes sont pauvres en certains acides aminés essentiels, notamment méthionine, lysine et tryptophane, d'où l'intérêt, pour améliorer leur valeur nutritive, de les associer notamment avec de la poudre de lait. COWAN *et al.* (1963), étudiant les amandes utilisées dans l'alimentation infantile au Liban, n'ont pas mis en évidence de substances pouvant être toxiques (substances cyanogénétiques) mais ont montré, comme GIRARD *et al.*, que la qualité des protéines de ces amandes et surtout leur efficacité étaient très inférieures à celles de la caséine, les acides aminés essentiels insuffisants étant méthionine, lysine, thréonine et tryptophane.

Parmi les variétés récoltées dans le verger d'étude de Manduel, nous pouvons faire quelques remarques : *Aï* est la plus riche en N et en P, et également une des plus riches en K, mais n'a qu'une teneur très moyenne en huile ; *Ardéchoise*, la plus riche en huile, est parmi les plus pauvres en protéines et en P, la plus pauvre en Ca et K. D'une façon générale, mais non absolue, nous trouvons une certaine tendance à ce que les variétés les plus riches en lipides soient les plus pauvres en protéines, et inversement. La figure 1 permet de juger rapidement de la teneur des différentes variétés en ces deux éléments.

CONCLUSION

L'étude de la composition chimique des fruits de quelques cultivars d'amandiers montre une grande variabilité de la plupart des constituants. Ces fruits sont actuellement de plus en plus recherchés et si, de par certains constituants, ils peuvent être un aliment intéressant, ce que nous connaissons de leur valeur protéique ne permet cependant pas de les considérer, consommés seuls, comme un nutriment de grande valeur, mais plutôt comme un aliment de luxe : desserts, confiserie. Ils sont cependant d'un grand intérêt pour de nombreux pays méditerranéens.

Les analyses d'un certain nombre de variétés de provenances diverses montrent bien l'influence des conditions écologiques et des techniques culturales sur la composition du fruit : l'étude de tels facteurs fera l'objet de travaux ultérieurs.

La plupart de ces variétés, et notamment *Aï* et *Ardéchoise*, sont à l'origine de nombreuses familles d'hybrides (GRASSELY, 1970) ; il sera donc intéressant de suivre analytiquement ces hybrides.

Nous pensons que ces études systématiques de la variabilité de la composition des différents cultivars d'une même espèce aideront à mieux adapter la production aux demandes des marchés et aux besoins des industries de transformation des produits agricoles.

Reçu pour publication en avril 1971.

SUMMARY

STUDY OF ALMOND (*AMYGDALUS COMMUNIS* L.)) QUALITY. VARIABILITY OF SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS

In France and many other countries, notably the Mediterranean Basin, almond cultivation is becoming more widespread. The results of variety selection give a wide choice of varieties and we have been studying some biochemical characteristics of the main ones cultivated in France.

Oil contents vary from 51 to 61.6 p. 100, nitrogen contents from 3.9 to 5.1 p. 100 for blanched almonds. Mineral elements also vary in fairly large proportions. Richness in Mn has been noticed, the *Nec plus Ultra* variety reaching 4,1 mg of Mn per 100 g of non de-oiled powder.

Yields after shelling and blanching have also been studied and discussed.

A short review of the litterature on the nutritional value of these seeds is given and though interesting from the point of view of some constituants (mineral elements) they are poor in some essential amino acids and need to be associated with casein to give a complete diet.

Better adaptation of production to utilization is gained from knowledge of the variability of chemical composition of the different fruit varieties.

RESUMEN

ESTUDIO ACERCA DE LA CALIDAD DE LAS ALMENDRAS (*AMYGDALUS COMMUNIS* L.) : VARIABILIDAD DE ALGUNOS CARACTERES BIOQUIMICOS

El cultivo del almendro presenta en Francia, así como en numerosos países, y en particular aquellos situados a orillas del Mediterráneo, un nuevo desarrollo. Los resultados de la selección varietal permite une amplia opción en cuanto a la variedades y hemos procedido al estudio de algunos caracteres bioquímicos de las principales de las mismas cultivadas en Francia.

Los porcentajes en aceite oscilan de un 51 a un 61,6 p. 100 y los del nitrógeno total de un 3,9 a un 5,1 p. 100 para las almendras mondadas. Los elementos minerales varían también en proporciones bastante importantes. Hemos observado que la riqueza de estos frutos en Mn, alcanzando en la variedad *Nec plus Ultra* un 4,1 mg de Mn p. 100 g de polvo no desaceitado.

También se ha sometido a estudio y discusión los rendimientos al rompimiento y al mondado.

Se hace mención de una breve revista de la literatura relativa al valor nutritivo de estos frutos en general y, si bien estos frutos son interesantes desde el punto de vista de la alimentación, debido a la presencia de algunos componentes (elementos minerales), no es menos cierto que su carencia en cuanto a ciertos ácidos aminados esenciales precisa, para un regimen completo, su combinación con la caseina, en particular.

El conocimiento de la variabilidad de la composición química de los frutos de las distintas variedades deberá permitir adaptar la producción a la utilización del mejor modo posible.

RIASSUNTO

STUDIO SULLA QUALITA' DELLE MANDORLE (*AMYGDALUS COMMUNIS* L.) : VARIABILITA' DI ALCUNI CARATTERI BIOCHIMICI

La coltura del mandorlo presenta in Francia e in numerosi altri paesi, specialmente nel bacino mediterraneo, un nuovo sviluppo. I risultati della selezione delle varietà permettono una scelta molto vasta dei tipi e abbiamo studiato alcuni caratteri biochimici dei principali tipi coltivati in Francia.

I tenori in olio variano da 51 a 61,6 p. 100, quelli dell' azoto totale da 3,9 a 5,1 p. 100 per delle mandorle mondate. Gli elementi minerali variano ugualmente in proporzioni molto importanti. Notiamo la richezza di questo frutto in Mn, la varietà *Nec plus ultra* raggiunge 4,1 mg di Mn per 100 g di polvere non disoleata.

I rendimenti allo spezzamento e alla mondatura sono stati ugualmente studiati e discussi.

È stata anche citata una breve scorsa della letteratura che concerne il valore nutritivo di questi semi e se a causa di alcuni costituenti (elementi minerali), questo frutto à interessante dal punto di vista alimentare, la sua povertâ per quanto riguarda alcuni amminoacidi essenziali richiede, per un regime completo, di unirlo in particolare con della caseina.

La conoscenza della variabilità della composizione chimica dei frutti di varia specie deve permettere di meglio adattare la produzione all'impiego.

REMERCIEMENTS

Nous remercions R. GUENNELON de la Station d'Agronomie du C. R. A. d'Avignon qui a bien voulu mettre à notre disposition le spectromètre de fluorescence X et J. CAUSERET, directeur de la Station de Recherches sur les Aliments de l'Homme pour ses suggestions et remarques concernant le manuscrit initial.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGER P., 1969. Aptitudes à la transformation industrielle de quelques variétés d'Amandes. *Bull. techn. Inform.*, (241), 577-580.

CARRANTE V., CUCURACHI A., 1966. *Andamento della inoliazione, carratteristiche chemico-fisiche e composizione acidica dell'olio di mandorle pugliesi.* Relazione presentata alla prima Giornata del Mandorlo. Convegno di studio. Bari, 24 ottobre 1966.

COWAN J. W., SABRY Z. I., RINNU F. J., CAMPBELL J. A., 1963. Evaluation of protein in Middle Eastern diets. I. Almonds. *J. Nutrit.*, **81**, 235-240.

GALL H., 1969. Expérience culturale d'un verger d'amandier sur les Costières du Gard. *Bull. techn. Inform.*, (241), 567-576.

GIRARD P., GUEZENNEC J., LANTAUME M.-T., LE CLERC A.-M., 1961. La valeur nutritive des protéines d'amandes. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **16** (1), 1-10.

GRASSELLY C., 1969. Caractéristiques des variétés d'amandier inscrites au Catalogue officiel. *Bull. techn. Inform.*, (241), 523-542.

GRASSELY C., GALL H., LÉGLISE P., 1969. Étude pomologique de quarante variétés d'amandier. *Bull. techn. Inform.*, (241), 507-521.

GRASSELLY C., 1970. (Communication personnelle).

HALL A. P., MOORE J. C., GUNNING B., COOK B. B., 1958. The nutritive value of fresh and roasted California-grown *Non Pareil* Almonds. *J. Agric. Food Chem.*, **8** (5), 377-382.

MITCHELL H. H., BEADLES J. R., 1937. The nutritive value of the proteins of nuts in comparison with the nutritive value of beef proteins. *J. Nutrit.*, **14**, 597.

SOUTY N., GUENNELON R., 1967. Essai de dosages des éléments minéraux dans les végétaux. I. Soufre. Dosage chimique (bombe à oxygène) et dosage par fluorescence X. *Ann. agron.*, **18** (6), 653-667.

SOUTY N., GUENNELON R., 1968. Essai de dosages des éléments minéraux dans les végétaux. II. Phosphore, Chlore, Potassium et Calcium. Dosages chimiques et dosages par fluorescence X. *Ann. agron.*, **19** (5), 569-587.

STRUSI A., 1960. Sulla composizione delle proteine in alcune varieta di Mandorle Pugliesi. *Atti del Congresso Internazionale del Mandorlo.* Bari, 10 Settembre.

THIAULT J., 1969. *Économie de l'Amande.* Journée nationale de l'Amande. Aix-en-Provence, 15 septembre.

ULRICH R., 1952. *La Vie des Fruits.* Masson, Paris.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 131-139.

ÉTUDE DES PHÉNOLS VOLATILS DE DEUX VINS ROUGES

P. DUBOIS, G. BRULÉ et M. ILIC *

avec la collaboration technique de Jocelyne DEKIMPE

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches, I. N. R. A.,
21 - Dijon

RÉSUMÉ

On a analysé les phénols volatils de deux vins rouges yougoslaves comme suit : addition d'éther diéthylique (10 p. 100 v/v), démixtion par du sulfate d'ammonium, distillation sous vide de l'éther et de l'éthanol, et extraction du résidu par l'éther diéthylique. Ce dernier extrait est séparé en trois fractions : composés neutres, acides carboxyliques et phénols.

Les phénols sont alors séparés en CPV en utilisant un diviseur de débit en sortie de colonne pour sentir ou piéger, ou une connection directe à un spectromètre de masse pour effectuer les identifications.

En plus du phénol, du *m*-crésol, de l'éthyl-4 phénol et du tyrosol, qui ont déjà été signalés dans les vins, nous avons trouvé du gaïacol, du vinyl-4 phénol, de l'éthyl-4 gaïacol, du vinyl-4 gaïacol, du diméthoxy-2,6 phénol, de l'acétovanillone, du *p*-hydroxybenzoate d'éthyle, du vanillate d'éthyle, de la syringaldéhyde, de l'acétosyringone et du syringate d'éthyle. Les identifications de l'eugénol, d'un triméthoxyphénol, d'un méthoxytyrosol et d'un isomère du vanillate d'éthyle, sont empreintes d'incertitudes. La plupart de ces composés ont déjà été signalés dans les eaux-de-vie vieillies en fûts de bois ou dans la fumée de bois. Certains d'entre eux peuvent avoir une influence sur les propriétés olfactives des vins.

Mots clés : *vin, phénols, arômes.*

I. — INTRODUCTION

Les méthodes analytiques généralement utilisées pour l'étude physico-chimique des arômes alimentaires nous ont semblé mal adaptées à l'extraction, à la détection et à l'identification des phénols volatils. Ces derniers sont, en effet, peu solubles dans les solvants les plus couramment employés lors des opérations d'extraction, et les phases liquides polaires utilisées lors des séparations par chromatographie en phase gazeuse conviennent très mal à leur séparation.

* Adresse actuelle : Institut de Viticulture et d'Œnologie, NIS (Yougoslavie).

Dans le cas des vins, les résultats préliminaires ont été indiqués dans une première publication, en même temps qu'étaient brièvement exposées les modifications apportées aux techniques (DUBOIS et BRULÉ, 1970).

Quatre mises au point récentes nous permettent d'abréger cette introduction : les deux premières concernent les composés volatils des vins (WEBB, 1967 ; KAHN, 1969), les deux autres traitent des composés phénoliques du raisin et du vin (RIBÉREAU-GAYON, 1968 ; SINGLETON et ESAU, 1969).

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Deux vins rouges d'origine yougoslave ont été utilisés lors de ces analyses. L'un et l'autre proviennent de vendanges saines du même cépage : le *Procupac* (*Vitis vinifera*) (ILIC et STANIMIROVIC, 1970). Ils ne diffèrent entre eux que par la durée du cuvage : six jours pour le premier qui est désigné du même nom que le cépage « Procupac », deux jours pour le second qui est appelé « Ruzica ».

Ces vins ont été étudiés deux ans après les vendanges de 1968, et un an et demi après leur mise en bouteilles.

Extraction

A un litre de vin, on ajoute 100 ml d'éther diéthylique et on sature de sulfate d'ammonium (DUBOIS, 1969). La phase organique qui se forme lentement contient la majeure partie des phénols. Elle est distillée sous vide jusqu'à élimination presque totale de l'éthanol, et le résidu aqueux est extrait par trois fois 50 ml d'éther diéthylique. Cet extrait éthéré est lavé successivement par une solution de bicarbonate de sodium à 10 p. 100 qui solubilise les acides carboxyliques, puis par une solution décinormale de soude qui solubilise les phénols. A chaque fois, les solutions alcalines sont extraites par de l'éther diéthylique de façon à obtenir de meilleures séparations entre les fractions contenant les composés neutres, les acides carboxyliques et les phénols. Puis ces mêmes solutions aqueuses sont acidifiées avec un excès de phosphate monosodique et extraites à l'éther.

Dans tous les cas, l'éther diéthylique utilisé est fraîchement distillé, car celui du commerce contient du BHT (ditertiobutyle hydroxytoluène), qui est un phénol volatil et qui y est ajouté pour limiter la formation de peroxydes.

Séparations chromatographiques et identifications

Seule la fraction phénolique a été analysée par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions indiquées sur la figure 1. L'utilisation d'un diviseur de débit à la sortie de la colonne permet d'effectuer un examen olfactif des effluents, ou de piéger les produits séparés. Ce piègeage a été fait sur des fragments de papier filtre qui sont ensuite placés dans un petit creuset servant à l'introduction directe d'un spectromètre de masse Varian-MAT, type CH 5. Les caractéristiques de source de ce dernier appareil sont : température 250°C, énergie des électrons 70 eV et courant cathode 100 μA. Les spectres sont obtenus à un pouvoir de résolution de l'ordre de 1 000.

Les hypothèses suggérées par ces spectres sont par la suite vérifiées par comparaison des volumes de rétention et des spectres de masse des composés étudiés et de composés témoins.

Composés témoins

Ceux-ci ont été achetés dans le commerce à l'exception des vinyl-4 phénol et vinyl-4 gaïacol qui ont été préparés à partir des aldéhydes para-hydroxybenzoïque et vanillique, par déshydratation en milieu acide des alcools secondaires formés par action de CH_3MgI.

Le tyrosol a été préparé par voie microbiologique à partir de la tyrosine, selon la technique employée par SAPIS (1967).

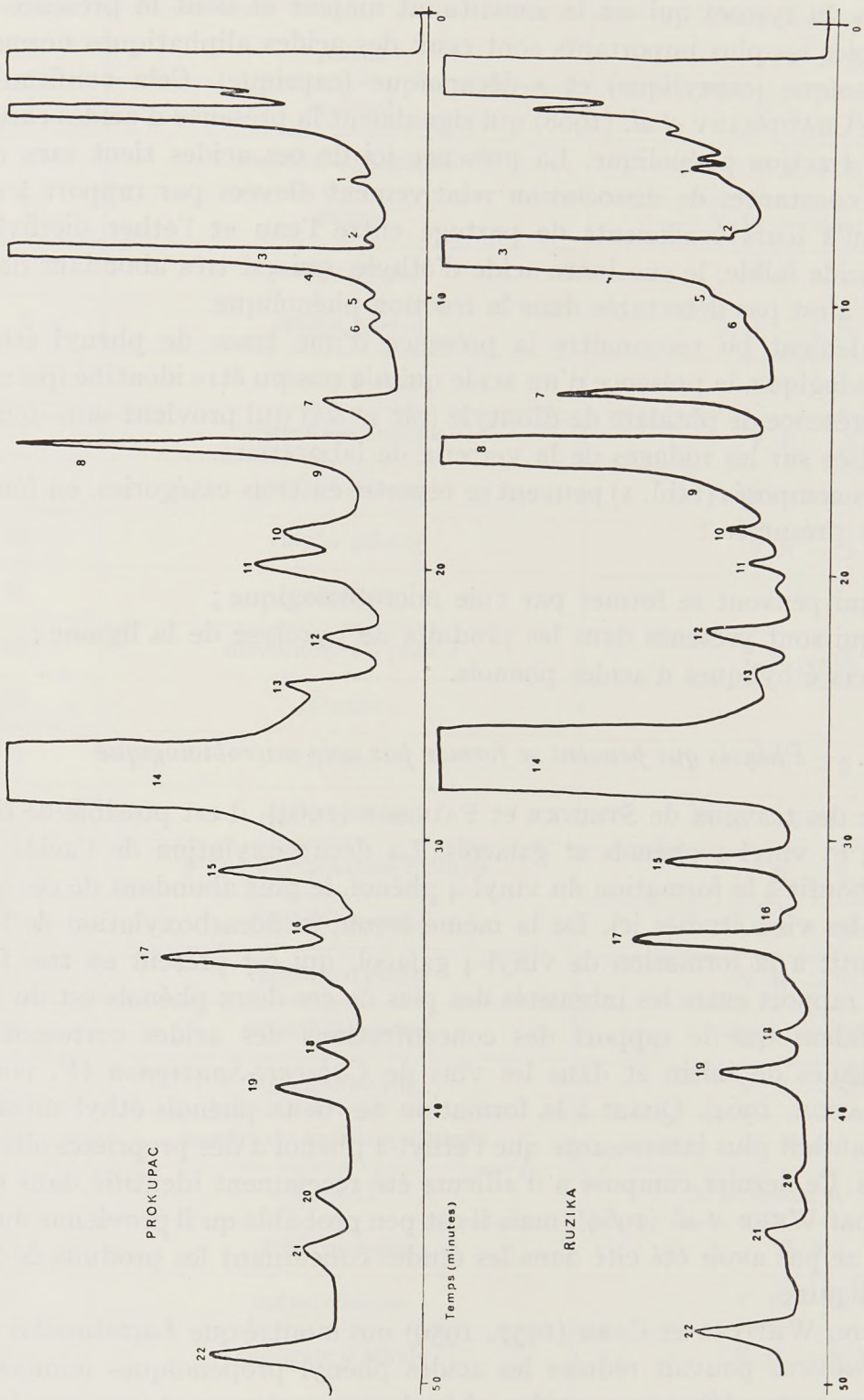


FIG. 1. — *Chromatogrammes obtenus sur une colonne d'un huitième de pouce* (4 mm) *de diamètre intérieur et 18 pieds de long* (5,5 m).
Phase liquide OV 17 à 5 p. 100.
Température programmée de 160 à 240°C à 2°C minute.
En ordonnée la mesure du flux d'ions total dans la source du spectromètre de masse.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

En dehors du tyrosol qui est le constituant majeur et dont la présence était attendue, les pics les plus importants sont ceux des acides aliphatiques normaux : l'acide *n*-octanoïque (caprylique) et *n*-décanoïque (caprique). Cela confirme une observation de CHAUDHARY *et al.* (1968) qui signalaient la présence d'acides carboxyliques dans la fraction phénolique. La présence ici de ces acides tient sans doute moins à leurs constantes de dissociation relativement élevées par rapport à celles des phénols qu'à leurs coefficients de partage entre l'eau et l'éther diéthylique, car un autre acide faible, le succinate acide d'éthyle, qui est très abondant dans la fraction acide, n'est pas détectable dans la fraction phénolique.

On a également pu reconnaître la présence d'une trace de phényl éthanol, ce qui est assez logique, la présence d'un acide qui n'a pas pu être identifié (pic n° 20), et surtout la présence de phtalate de dibutyle (pic n° 23) qui provient sans doute de la graisse utilisée sur les rodages de la verrerie de laboratoire.

Les autres composés (tabl. 1) peuvent se répartir en trois catégories, en fonction de leur origine présumée :

1. ceux qui peuvent se former par voie microbiologique ;
2. ceux qui sont présents dans les produits de pyrolyse de la lignine ;
3. les esters éthyliques d'acides phénols.

1. — *Phénols qui peuvent se former par voie microbiologique*

A la suite des travaux de STEINKE et PAULSON (1964), il est possible de classer ici les éthyl-4 et vinyl-4 phénols et gaïacols. La décarboxylation de l'acide para-coumarique aboutit à la formation du vinyl-4 phénol, le plus abondant de ces quatre phénols dans les vins étudiés ici. De la même façon, la décarboxylation de l'acide férulique aboutit à la formation de vinyl-4 gaïacol, qui est présent en très faibles quantités. Le rapport entre les intensités des pics de ces deux phénols est du même ordre de grandeur que le rapport des concentrations des acides correspondants dans les pellicules de raisin et dans les vins de *Cabernet-Sauvignon* (*V. vinifera*) (RIBÉREAU-GAYON, 1964). Quant à la formation des deux phénols éthyl substitués, elle semble d'autant plus intéressante que l'éthyl-4 phénol a des propriétés olfactives très marquées. Ce dernier composé a d'ailleurs été récemment identifié dans un vin vieilli en fût par WEBB *et al.* (1969), mais il est peu probable qu'il provienne du bois, car il semble ne pas avoir été cité dans les études concernant les produits de dégradation de la lignine.

Par contre, WHITING et CARR (1957, 1959) ont montré que *Lactobacillus pastorianus* var. *quinicus* pouvait réduire les acides phényl propénoïques (cinnamique, para-coumarique et caféïque) en acides phényl propanoïques, et que ces derniers pouvaient être décarboxylés par cette même bactérie en phénols éthyl substitués correspondants.

Par ailleurs, le méta-crésol, dont on a trouvé une trace dans ces deux vins, a été identifié dans d'autres vins de coupage où il était présent à des concentrations

TABLEAU I

Pic n°	Nature	Modes d'identification
1	phénol	V. R. — S. M.
2	*m*-crésol	V. R. — S. M.
3	acide *n*-octanoïque	V. R. — S. M.
4	gaïacol	V. R. — odeur (S. M.)
5	phényl éthanol	V. R. — odeur
6	éthyl-4 phénol	V. R. — S. M. — odeur
7	vinyl-4 phénol	V. R. — S. M.
8	acide *n*-décanoïque	V. R. — S. M.
9	éthyl-4 gaïacol	V. R. — odeur (S. M.)
10	vinyl-4 gaïacol	V. R. — S. M.
11	eugénol	V. R.
12	diméthoxy-2-6 phénol	V. R. — (S. M.)
13	inconnu	
14	tyrosol	V. R. — S. M.
15	acétovanillone	V. R. — S. M. — odeur
	p-hydroxy benzoate d'éthyle	V. R. — S. M.
16	méthoxy tyrosol	voir le texte
17	vanillate d'éthyle	V. R. — S. M.
18	triméthoxyphénol	voir le texte (S. M.)
19	syringaldéhyde	V. R. — S. M.
	isomère du vanillate d'éthyle	(S. M.)
	inconnu	S. M. donne $M^+ = 178$
20	acide inconnu	(S. M.)
21	acétosyringone	V. R. — S. M.
22	syringate d'éthyle	V. R. — S. M.

V. R. : même volume de rétention que le composé témoin.
S. M. : même spectre de masse que le composé témoin.
(S. M.): spectre de masse obtenu sur un autre échantillon de vin ou composé témoin non disponible.
odeur : reconnaissance olfactive à la sortie du chromatographe.

plus élevées (DUBOIS et BRULÉ, 1970). De leur côté, CHAUDHARY *et al.* (1968) le signalent dans un vin provenant de vendanges botrytisées. Ce composé fait également partie des produits de pyrolyse de la lignine.

Enfin, le méthoxy tyrosol pourrait provenir de la méthoxy tyrosine selon le mécanisme d'Ehrlich, car le spectre de masse de ce composé présente trois pics importants pour $m/e = 168$, 137 et 107, ce qui pourrait correspondre aux fragmentations de la figure 2, mais sans indications sur la position respective des substituants. La formation d'un cycle à 7 atomes de carbone (Tropylium) est caractéristique des alkyls benzènes substitués (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1965).

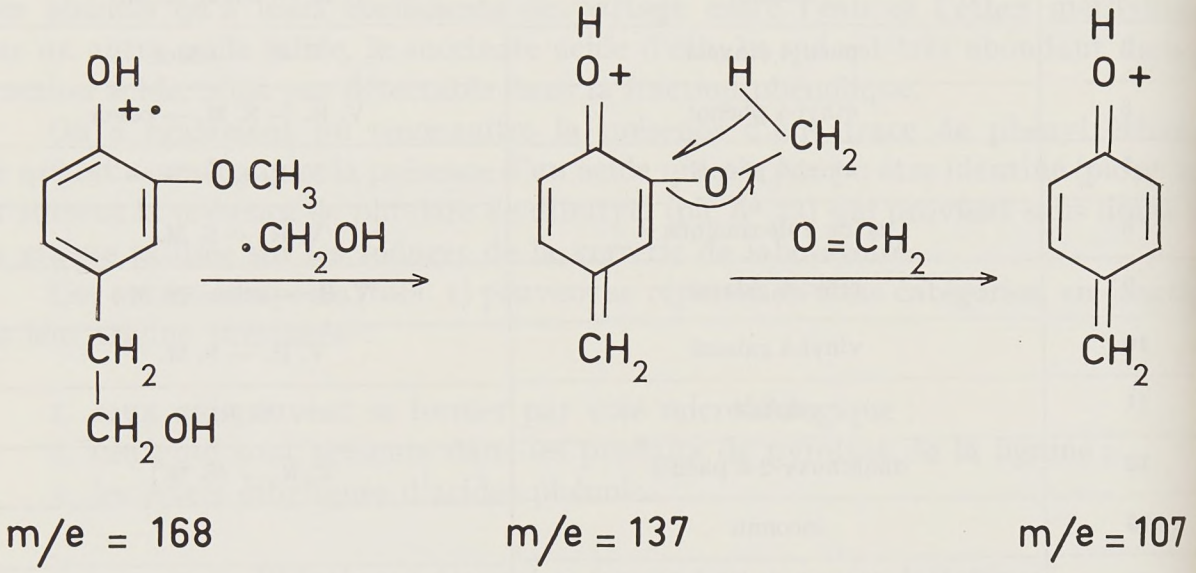


FIG. 2. — *Fragmentations du méthoxy-tyrosol*

2. — *Phénols présents dans les produits de pyrolyse de la lignine*

Les produits de décomposition de la lignine rencontrés ici sont pour certains connus depuis fort longtemps (LICHTENBERGER, 1938) ; d'autres au contraire ont été récemment identifiés, notamment dans la fumée de bois (FIDDLER *et al.*, 1970). Au nombre des premiers, il faut citer le phénol, le méta-crésol et le gaïacol (qui est élué dans la traînée du pic d'acide *n*-octanoïque). Au nombre des seconds, on a trouvé le diméthoxy-2-6 phénol, l'acétovanillone, l'acétosyringone et la syringaldéhyde.

Ces composés sont présents dans les deux vins étudiés en quantités très faibles alors que dans d'autres vins on avait trouvé du phénol et du méta-crésol de façon beaucoup plus importante. Ces deux phénols ont été identifiés dans des vins par CHAUDHARY *et al.* (1968).

Enfin, il est probable que le triméthoxyphénol, dont l'identification reste très incertaine, puisse appartenir à cette catégorie.

3. — *Esters éthyliques d'acides phénols*

La présence d'acides para-hydroxy benzoïque, vanillique et syringique dans les raisins et dans les vins fait que l'identification de leurs esters éthyliques n'est pas étonnante. La présence probable d'un isomère du vanillate d'éthyle laisserait sup

poser la présence d'un isomère de l'acide vanillique, mais sa structure exacte n'a pas pu être déterminée.

S'il est présent, le salicylate d'éthyle est élué dans la traînée du pic de vinyl-4 phénol et s'y trouve masqué.

IV. — CONCLUSION

Cette étude porte essentiellement sur l'analyse qualitative des phénols volatils des vins. Bon nombre de ceux qui ont été identifiés ici ont déjà été signalés dans d'autres produits végétaux, et notamment dans des eaux-de-vie conservées en fût (KAHN, 1969).

Par ailleurs ces deux vins sont très proches quant à la nature des phénols volatils qu'ils renferment, mais nous avons pu constater que le vin « Procupac » était beaucoup plus riche en ce type de constituants que le vin « Ruzica ». Cela peut résulter de la durée du cuvage, et il apparaît intéressant d'envisager l'étude quantitative de ces phénols sur des vins d'autres origines. Quoi qu'il en soit, certains de ces dérivés ont des propriétés olfactives susceptibles de jouer un rôle appréciable sur la qualité de l'arôme des vins.

Reçu pour publication en mai 1971.

SUMMARY

STUDY OF VOLATILE PHENOLS OF TWO RED WINES

Two red wines from Yougoslavia were analyzed for volatile phenols as follows : addition of diethyl ether (10 p. 100 v/v), demixtion by ammonium sulfate, vacuum distillation of ether and ethanol and extraction of the residue with diethyl ether. This last extract is separated in three fractions : neutral compounds, carboxylic acids and phenols.

The phenols are then separated by GC using a by-pass at the end of the column for smelling and trapping, or a direct connection to a mass spectrometer for identifications.

In addition to phenol, *m*-cresol, 4-ethyl phenol and tyrosol which have been already described in wines, we found guaïacol, 4-vinyl phenol, 4-ethyl guaïacol, 4-vinyl guaïacol, 2-6-dimethoxy-phenol, acetovanillone, ethyl *p*-hydroxy benzoate, ethyl vanillate, syringaldehyde, acetosyringone, ethyl syringate. Identifications of eugenol, a trimethoxy phenol, a methoxy tyrosol and of an isomer of ethyl vanillate were only tentative. Most of these compounds have been already described in wood aged liquors or in wood smoke. Some of them may have an interest in olfactive properties of wines.

RESUMEN

ESTUDIO DE LOS FENOLES VOLATILES DE DOS VINOS TINTOS

Se ha procedido al analisis de los fenoles volátiles de dos vinos tintos yugoslavos, de la forma siguiente : adición de éter dietílico, 10 p. 100 v/v), desdoble por sulfato de amonio, destilación en vacío del éter y del etanol y extracción del residuo por medio de éter dietílico. Este último extracto queda separado en tres fracciones : compuestos neutros, ácidos carboxílicos y fenoles.

Los fenoles quedan separados después por cromatografía en fase de vapor, utilizando un divisor de caudal en salida de columna sensitiva o de trampa de vapor, o una conexión directa con un espectrómetro de masa para llevar a cabo las identificationes.

Además del fenol, del *m*-cresol, del etil-4 fenol y del tirosol, que ya dan sido señalados en los vinos, hemos encontrado guayacol, vinil-4 fenol, etil-4 guayacol, vinil-4 guayacol, dimetoxi-2,6 fenol, acetovanilona, *p*-hidroxibenzoato de etilo, vanilato de etilo, seringaldehida, acetosiringona y siringato de etilo. Las identificaciones del eugenol, de un trimetoxifenol, de un metoxitirosol y de un isómero del vanilato de etilo, se encuentran marcadas de incertidumbre. La mayor parte de estos componentes han sido ya señalados en los aguardientes añejados en barricas de madera y en el humo de madera. Algunos de los mismos pueden tener una influencia sobre las propiedades olfactivas de los vinos.

RIASSUNTO

STUDIO DEI FENOLI VOLATILI DI DUE VINI ROSSI

I fenoli volatili di due vini rossi iugoslavi sono stati analizzati nel modo seguente : aggiunta di etere dietilico (10 p. 100, v/v), separazione mediante solfato d'ammonio, distillazione sotto vuoto dell'etere e dell'etanolo ed estrazione del residuo mediante l'etere dietilico. Quest'ultimo estratto separato in tre frazioni : composti neutri, acidi carbossilici e fenoli.

I fenoli vengono quindi separati in cromatografia in fase vapore impiegando un separatore d'erogazione all'uscita di colonna per sentire o sondare, oppure un raccordo diretto a uno spettrometro di massa per effettuare le identificazioni.

Oltre il fenolo, *m*-cresolo, etil-4 fenolo e tirosolo che sono stati gi segnalati nei vini, noi abbiamo trovato del guaiacolo, del vinil-4 fenolo, dell'etil-4 guaiacolo, del vinil-4 guaiacolo, del dimetossi-2, 6 fenolo, dell' acetovaniglione, del *p*-idrosibenzoato d'etile, del vanigliato d'etile, della siringaldeide, dell' acetosiringone e del siringato d'etile. Le identificazioni dell' eugenolo, di un trimetossifenolo, di un metossi tirosolo e di un isomero del vinigliato d'etile, lasciano sussistere delle incertezze. La maggior parte di questi composti sono stati già segnalati nell'acquavite invecchiata in fusti di legno o nel fumo di legno. Alcuni di essi possono avere un'influenza sulle proprietâ olfattive dei vini.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BUDZIKIEWICZ H., DJERASSI C., WILLIAMS D. H., 1965. *Interpretation of mass spectra of organic compounds.* Holden-Day Inc.

CHAUDHARY S. S., WEBB A. D., KEPNER R. E., 1968. G. L. C. investigation of the volatile compounds in extracts from *Sauvignon Blanc* wines from normal and botrytized grapes. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **19** (1), 6-12.

DUBOIS P., 1969. Extraction des composés volatils en solutions hydroalcooliques par démixtion avec des sels. *Ann. Technol. agric.*, **18** (3), 241-247.

DUBOIS P., BRULÉ G.. 1970. Étude des phénols volatils des vins rouges. *C. R. Acad. Sci.*, **271**, Série D, 1797-1598.

FIDDLER W., DOERR R. C., WASSERMAN A. E., 1970. Composition of an ether soluble fraction of a liquid smoke solution. *J. agric. Food Chem.*, **18** (2), 310-312.

ILIC M., STANIMIROVIC I., 1970. Caractéristiques technologiques des vins de Procupac (en yougoslave). *Vinogr. Vinar.*, **3** (9), 83-99.

KAHN J. H., 1969. Compounds identified in whisky, wine, and beer : a tabulation. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **52** (6), 1166-1178.

LICHTENBERGER J., 1938. in : GRIGNARD V., DUPONT G., LOCQUIN R. : *Traité de Chimie organique* t. **8**, 1021-1087, Masson et Cie, Paris.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. vég.*, **6** (2), 119-147.

RIBÉREAU-GAYON P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux.* Dunod, Paris.

SAPIS J. C., 1967. *Contribution à l'étude dans les vins du tyrosol, du tryptophol, de l'alcool phényléthylique et de la γ-butyrolactone, produits secondaires de la fermentation alcoolique.* Thèse de 3e cycle, n° 48, Bordeaux.

SINGLETON V. L., ESAU P., 1969. *Phenolic substances in grapes and wine, and their significance.* Academic Press, New York et Londres.

STEINKE R. D., PAULSON M. C., 1964. The production of steam-volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain. *J. agric. Food Chem.*, **12** (4), 381-387.

WEEB A. D., 1967. Wine Flavor : Volatile aroma compounds of wines. in : *The chemistry and physiology of flavors*, 203-227, The AVI Publishing Co.

WEEB A. D., KEPNER R. E., MAGGIORA L., 1969. Some volatile components of wines of *Vitis vinifera* varieties Cabernet-Sauvignon and Ruby Cabernet. I. Neutral Compounds. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **20** (1), 16-24.

WHITING G. C., CARR J. G., 1957. Chlorogenic acid metabolism in cider fermentation. *Nature*, London, **180** (4600), 1479.

WHITING G. C., CARR J. G., 1959. Metabolism of cinnamic acid and hydroxycinnamic acids by *Lactobacillus pastorianus* var. *quinicus*. *Nature*, London, **184** (4696), 1427-1428.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 141-151.

COMPARAISON DES PRODUITS FIXES ET VOLATILS DE VARIÉTÉS DE FRAMBOISES A DIVERS STADES DE MATURITÉ

J. DUCLOS et A. LATRASSE

avec la collaboration technique de Françoise MAGNON et Denise DEMAIZIÈRES

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches, I. N. R. A.,
21 - Dijon

RÉSUMÉ

La composition des framboises à divers stades de maturité (véraison à surmaturation) a été étudiée sur onze variétés implantées sur un domaine expérimental en Bourgogne. Pour cela, nous avons suivi l'évolution des *produits fixes* (rendement en jus et résidu insoluble dans l'eau, sucres, acidité et pH, substances pectiques et intensité de la coloration) et des *produits volatils* (substances volatiles réductrices totales, méthanol, éthanol, produits carbonylés, acétate d'éthyle, alcools supérieurs, spectre UV des distillats). L'évolution rapide du fruit est marquée par l'accumulation des sucres (glucose et fructose), par l'abaissement de l'acidité titrable (acide citrique), par la dégradation des protopectines et par l'intensification de la coloration. Dans le même temps, la teneur en produits volatils réducteurs augmente considérablement. Ils sont constitués en fractions sensiblement égales par des produits carbonylés et de l'éthanol. Le spectre UV des distillats de fruits peut constituer un indice de maturation.

Mots clés : *framboise, variétés, maturité, composition.*

I. — INTRODUCTION

La framboise est un petit fruit qui évolue rapidement au cours de sa maturation. Cette caractéristique conditionne sa cueillette et ses aptitudes technologiques. Nous avons suivi cette évolution dans une plantation expérimentale en analysant les produits fixes et les produits volatils de diverses variétés.

La composition générale en produits fixes de quelques variétés de framboises a été étudiée par LEINBACH, SEEGMILLER et WILBUR (1951) sur des fruits provenant de différentes localités de la côte ouest des U. S. A. et cueillis au stade de maturité commerciale. Ces auteurs donnent une bibliographie des travaux effectués depuis 1913. Plus récemment, BOLAND, BLOMQUIST et ESTRIN (1968) présentent des

fiches d'analyse de cinq variétés cultivées dans l'Orégon. La composition d'une vingtaine de variétés implantées en Anjou a été comparée par DUCLOS, DUPUY et LANTIN (1971).

L'arôme de la framboise a fait l'objet de nombreuses études analytiques et il convient de mentionner notamment celle des laboratoires Firminich et Cie de Genève ; WINTER *et al.* (1962) y mettent au point l'extraction des produits volatils. Ils analysent les produits carbonylés (WINTER et SUNDT, 1962), puis les alcools volatils (SUNDT et WINTER, 1962). En 1963, PALLUY, SUNDT et WINTER complètent ces travaux par l'analyse des acides et des esters inférieurs. D'autre part, NURSTEN et WILLIAMS (1967) ont publié, dans un article exhaustif sur les arômes, une liste des produits volatils de la framboise identifiés avec certitude selon plusieurs techniques.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Origine des échantillons*

Les échantillons de onze variétés étudiées proviennent d'une collection que nous avons établie au domaine expérimental de Dijon-Époisses. Les plants ont été mis en place au cours de l'hiver 1968-1969. Les distances de plantation sont de 2,5 m entre les rangs et 0,5 m sur la ligne. Les tiges sont palissées verticalement sur 3 fils.

Pour chaque variété, les fruits sont cueillis le même jour à divers stades de maturité et répartis en 3 ou 4 classes correspondant à une homogénéité de couleur et de fermeté.

Les échantillons réservés à l'analyse des produits fixes sont immédiatement congelés par de la glace carbonique et conservés à — 22°C dans des sachets hermétiques. La composition en produits volatils est obtenue à partir de distillats provenant de fruits frais traités par entraînement à la vapeur d'eau.

2. — *Analyse des produits fixes*

Nous rappelerons brièvement les techniques analytiques utilisées qui figurent déjà dans une publication antérieure (DUCLOS, DUPUY et LANTIN, 1971).

a) *Jus et résidu sec.*

Le rendement d'extraction du jus est mesuré après broyage modéré des fruits, puis centrifugation (10 mn à 20 000 *g*) et exprimé en ml/kg de fruit. Après lavage et centrifugation, le culot est séché, puis pesé. Le résidu sec insoluble dans l'eau s'exprime ainsi en g/kg de fruit.

b) *Sucres.*

Les sucres totaux sont dosés par la méthode colorimétrique à l'anthrone (à 620 nm) qui se prête bien aux analyses en séries (HAAS et FLEISCHMAN, 1958; GUIMBERTEAU, 1960). Ils sont exprimés en g/kg de fruit.

c) *Acidité et pH.*

Ces mesures sont obtenues au pHmètre-titrimètre. L'acidité est titrée par la soude jusqu'à pH 8,4 et exprimée en g d'acide citrique par kg de fruits. La nature des acides organiques est déterminée par chromatographie sur couche mince de polycarbonate de phényl-propane selon la technique proposée par MONTIES et BIDAN (1967).

d) *Coloration.*

L'intensité de la coloration est mesurée par la densité optique du jus au maximum d'absorption (515 nm) avec des cuves de 0,2 cm d'épaisseur.

e) *Substances pectiques.*

Les substances pectiques totales sont d'abord isolées et purifiées par précipitation et lavage à l'alcool. Les différentes fractions sont extraites successivement par l'eau (acides pectiniques), par l'oxalate d'ammonium à 0,75 p. 100 (acides pectiques) et par la soude 0,05 N (protopectines) selon la méthode décrite par Rouse et Atkins (1955).

L'acide galacturonique des 3 extraits est dosé par colorimétrie d'après la réaction de Dische au carbazol (McComb et McCready, 1952; Lenges *et al.*, 1969). Les résultats sont exprimés en g d'anhydride galacturonique par kg de fruit.

3. — *Analyse des produits volatils*

a) *Extraction.*

Un échantillon de 200 g de fruits frais est broyé dans 150 ml d'eau distillée et traité par entraînement à la vapeur d'eau. On recueille 100 ml de distillat sur lequel on fait toutes les déterminations. Une droite d'étalonnage est établie pour chaque fonction et un standard est introduit dans chaque série à doser.

b) *Réducteurs totaux.*

Une prise de 10 ml est oxydée par addition de 10 ml de mélange sulfochromique ($K_2Cr_2O_7$ à 2 p. 100, H_2SO_4 concentré à 40 p. 100 en volume). Le mélange est porté 1 heure à reflux et, après refroidissement, complété à 50 ml avec de l'eau distillée. Le dosage se fait par colorimétrie de Cr^{3+} à 580 nm. Une droite d'étalonnage est obtenue avec des solutions d'éthanol de 0°1 à 0°5 GL (standard à 0°25 GL). Les substances volatiles réductrices totales sont ainsi estimées en mg d'éthanol par kg de fruit.

c) *Méthanol.*

Le méthanol est oxydé en formol par $KMnO_4$ en milieu acide. En présence d'acide chromotropique et en milieu sulfurique, le formol donne une coloration violette dont le maximum d'absorption est à 560 nm (réaction d'Eegriwe, 1937). Le dosage est effectué sur une prise de distillat de 2 ml selon la méthode de Bouzigues (1955). Une droite d'étalonnage est obtenue avec des solutions de méthanol de 25 à 175 µl/l (standard à 75 µl/l). Le méthanol est ainsi dosé à partir de 10 µg, ce qui permet de le déterminer dans les fruits à partir de 2,5 mg/kg.

d) *Carbonyls totaux.*

Les produits carbonylés sont transformés en 2-4 dinitrophénylhydrazones qui, en milieu alcalin, donnent une coloration vineuse dont le maximum d'absorption se situe à 430 nm. Ils sont ainsi déterminés sur une prise de distillat de 1 ml selon la méthode de Lappin et Clark (1951). Une droite d'étalonnage est établie avec des solutions d'heptanal de 25 à 125 µl/l (standard à 75 µl/l). La sensibilité du dosage atteint 1,3 µg et les produits carbonylés totaux du fruit peuvent être ainsi déterminés à partir d'un équivalent d'heptanal de 0,65 mg/kg.

e) *Acétate d'éthyle.*

C'est le seul ester identifié avec certitude dans les produits volatils de la framboise. Il a été dosé selon la méthode de Goddu, Le Blanc et Wright (1955).

Les esters se transforment en présence d'hydroxylamine alcaline en acides hydroxamiques qui, en présence d'ions ferriques, donnent des chélates violets dont le maximum d'absorption est à 530 nm.

Une droite d'étalonnage est établie avec des solutions d'acétate d'éthyle de 50 à 400 µl/l (standard à 200 µl/l).

La sensibilité du dosage atteint 100 µg d'ester contenus dans 10 ml de distillat et il peut être déterminé dans le fruit à partir de 5 mg/kg.

f) *Alcools supérieurs.*

Les alcools supérieurs donnent, en milieu sulfurique et en présence de diméthylaminobenzaldéhyde, une coloration rouge dont le maximum d'absorption est à 530 nm. Ils ont été dosés sur une prise de distillat de 4 ml selon la méthode de Guymon et Nakagiri (1952).

Une droite d'étalonnage est établie avec des solutions d'hexanol de 10 à 50 µl/l (standard à 20 µl/l). La sensibilité du dosage atteint 6 µg. Les alcools supérieurs sont ainsi déterminés dans le fruit à partir d'un équivalent en hexanol de 0,75 mg/kg.

g) *Éthanol.*

L'éthanol est dosé par voie enzymatique en présence d'alcool déshydrogénase (ADH) et de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) dont la forme réduite présente un maximum d'absorption à 340 nm (BONNICHSEN et THEORELL, 1951). Il est dosé sur une prise de distillat de 0,1 ml. Cette méthode a déjà été utilisée par TANNER et BRUNNER (1964) pour déterminer les faibles quantités d'éthanol présentes dans les boissons et les arômes.

Une droite d'étalonnage est tracée au moyen de solutions de 0,1 à 0,5 g/l d'éthanol (standard à 0,25 g/l).

La sensibilité de la méthode atteint 0,8 µg et l'éthanol peut être ainsi dosé dans les fruits à partir de 4 mg/kg.

h) *Spectre UV des distillats.*

Les distillats de framboises absorbent dans l'UV et présentent deux maximums, l'un à 228 nm, l'autre à 275 nm.

III. — RÉSULTATS

Les résultats de l'analyse des produits fixes et des produits volatils sont donnés dans le tableau 1.

1. — *Produits fixes*

a) *Rendement en jus.*

Le rendement en jus augmente au cours de la maturation et suivant les variétés de 8 p. 100 (*Puyallup*) à 20 p. 100 (*Heytor*). Il est la conséquence de deux facteurs : la turgescence des fruits et la diminution des protopectines qui facilite la libération du jus. Il existe un parallélisme entre la dégradation des protopectines et le rendement : *Puyallup* présente un taux de protopectines stable et un rendement assez constant selon l'état de maturité, tandis que l'augmentation importante du rendement en jus d'*Heytor* coïncide avec une dégradation plus forte des protopectines.

On remarquera que, dans l'état de surmaturation, deux effets contraires se manifestent : d'une part le taux de protopectines est très bas, mais d'autre part le fruit commence à se dessécher. Ceci est en particulier visible si l'on considère les états de maturité III et IV de la variété *Puyallup*.

b) *Sucres.*

L'accumulation des sucres est très active au cours de la maturation et leur taux augmente rapidement malgré la dilution due à la turgescence des fruits. Il passe de 53 à 70 g/kg pour la variété *Rose de Plombières*, par exemple.

Ces sucres sont constitués en majeure partie par 60 à 90 p. 100 de sucres réducteurs suivant les variétés (glucose et fructose en parties égales), le reste étant constitué par du saccharose. Dans l'état de maturité commerciale, les teneurs en sucres varient de 44 g (*Zeva remontante* et *Heytor*) à 74 g (*Rose de Plombières* et *Puyallup*).

c) *Acidité et pH.*

L'acidité titrable diminue au cours de la maturation, conséquence de la turgescence (ex. *Rose de Plombières* : 26 à 18 g d'acide citrique par kg). Consécu-

tivement, le pH s'accroît de 2,8 à 3,2 en moyenne. Cette acidité est essentiellement due, pour 95 p. 100 environ, à l'acide citrique. On ne trouve que des traces d'acide malique à tous les stades de maturité considérés.

d) *Rapport sucres/acidité* (*S/A*).

Le rapport S/A croît au cours de la maturation. Pratiquement sa valeur double pour chaque variété lorsque le fruit passe de la véraison commençante à la surmaturation. L'augmentation de ce rapport tient aux évolutions contraires des teneurs en sucres et en acide.

e) *Coloration.*

L'intensité de la coloration des fruits augmente rapidement et d'une façon importante au cours de la maturation. La densité optique des jus passe en moyenne de 1 à 2-3 et même de 1 à 6 pour les variétés très colorées telles que *Schoenemann*, *Puyallup* et *Zeva remontante*. Par contre, les *Malling*, surtout *Malling Landmark*, sont très peu colorées.

f) *Substances pectiques.*

La teneur en pectines totales diminue au cours de la maturation. Cette baisse est due essentiellement à la dégradation des protopectines qui est variable suivant les variétés; ainsi elle est par exemple très prononcée pour *Malling Exploit* alors qu'elle est pratiquement insensible pour *Puyallup*. La diminution du taux de protopectines s'accompagne d'une augmentation du taux des acides pectiniques ; ce phénomène a été signalé notamment dans le cas des abricots par Souty, André et Poggi (1969). Les acides pectiques restent sensiblement stables dans les premiers états de maturité considérés. Leur taux augmente surtout dans les fruits très mûrs où les pectines sont plus fortement dégradées avec une déméthylation plus intense (le taux de méthanol libéré se trouve nettement accru dans les fruits surmûris).

2. — *Produits volatils*

Les produits volatils contenus dans les distillats ont été estimés par fonction (réducteurs totaux, carbonyls totaux, alcools supérieurs) et quelques composés ont été dosés spécifiquement (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle).

a) *Réducteurs totaux.*

La teneur en produits volatils réducteurs augmente considérablement au cours de la maturation. Bien que l'on note des différences entre les variétés, la teneur du fruit surmûri est généralement triple de celle du fruit pris à véraison commençante. (ex. *Lloyd George*). Cette teneur est même quadruplée pour *Jochem Roem*. Mais on ne peut pas relier directement la quantité de produits volatils réducteurs à l'intensité du parfum et à ses notes particulières. Nous avons remarqué au moment du broyage des fruits (surtout les *Malling*) une odeur d'hydrogène sulfuré, composé signalé par Winter *et al.* (1962).

b) *Méthanol.*

La maturation s'accompagne d'un accroissement marqué de la teneur en méthanol qui varie, par exemple, de 11 à 43 mg/kg chez *Jochem Roem* entre les états

TABLEAU I : *Composition des framboises à divers stades de maturité*

Variété	État de maturité	Produits fixes (g/kg)											Produits volatils (mg/kg)						
		Jus (ml)	Résidu sec	Sucres	Acidité (acide citrique)	pH jus	DO jus (515 nm)	S/A	Substances pectiques				PV totaux	Méthanol	Carbonyls	Acétate d'éthyle	Alcools supérieurs	Éthanol	DO distillat (275 nm)
									Acides pectiniques	Acides pectiques	Proto-pectines	SP totales							
Malling Exploit	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	187	10	37	0	5	25	0,15
	II	673	56	50	21,4	2,91	1,0	2,3	3,6	0,5	2,4	6,5	192	10	63	0	4	46	0,16
	III	705	50	55	20,0	2,99	1,4	2,7	1,9	0,6	1,5	4,0	216	14	93	0	6	87	0,18
	IV	730	45	61	18,5	3,08	1,8	3,3	2,5	0,5	0,3	3,3	402	23	147	16	5	162	0,34
Malling Jewel	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	266	11	136	0	2	98	0,21
	II	660	60	48	16,0	3,13	1,6	3,0	2,5	0,8	1,8	5,1	279	14	193	0	2	137	0,27
	III	668	46	50	13,2	3,25	1,7	3,8	3,0	0,7	1,4	5,1	485	22	227	28	4	205	0,32
Malling Landmark	I	650	72	53	27,6	2,95	0,5	1,9	2,1	0,6	2,3	5,0	122	12	177	0	3	57	0,18
	II	701	48	57	19,3	3,05	1,2	2,9	2,7	0,8	1,1	4,6	275	16	150	5	2	85	0,29
	III	713	48	62	17,7	3,15	1,2	3,5	2,6	0,8	1,2	4,6	—	—	—	—	—	—	—
Malling promise	I	637	63	33	22,5	2,96	0,8	1,5	0,9	0,5	2,6	4,0	106	7	49	0	5	45	0,18
	II	669	58	46	21,8	3,00	1,5	2,1	1,7	0,5	1,6	3,8	135	9	94	0	4	60	0,14
	III	686	54	50	18,9	3,12	2,7	2,7	1,6	0,6	1,3	3,5	280	23	105	0	5	116	0,15
Jochem Roem	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	111	11	70	0	1	38	0,15
	II	712	54	42	23,1	2,91	2,2	1,8	2,1	0,7	1,5	4,3	189	17	78	0	2	93	0,15
	III	741	49	46	20,3	2,98	3,5	2,3	2,0	0,8	1,4	4,2	276	32	115	8	3	112	0,18
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	407	43	140	16	3	127	0,21
Rose de Plombières	I	665	62	53	26,2	2,83	0,8	2,0	1,7	1,0	2,0	4,7	108	4	60	0	4	60	0,09
	II	715	45	66	19,0	3,08	1,8	3,5	1,9	0,8	1,4	4,1	145	7	138	10	5	131	0,20
	III	723	51	70	18,3	3,11	2,0	3,8	2,0	0,8	1,3	4,1	286	6	147	10	8	170	0,24

TABLEAU I *(suite)*

Variété	État de maturité	Produits fixes (g/kg)											Produits volatils (mg/kg)						
		Jus (ml)	Résidu sec	Sucres	Acidité (acide citrique)	pH jus	DO Jus (515 nm)	S/A	Substances Pectiques				PV totaux	Méthanol	Carbonyls	Acétate d'éthyle	Alcools supérieurs	Éthanol	DO distillat (275 nm)
									Acides pectiniques	Acides pectiques	Proto-pectines	SP totales							
Schoenemann	I	665	61	44	23,3	2,34	0,9	1,9	0,9	1,0	2,5	4,4	—	—	—	—	—	—	—
	II	693	57	47	22,4	2,65	1,6	2,1	1,4	1,2	1,3	3,9	236	15	181	16	3	80	0,23
	III	752	54	59	15,9	3,01	4,4	3,7	1,3	1,0	1,3	3,6	325	17	245	21	5	108	0,24
Lloyd George	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	117	10	97	0	0	70	0,21
	II	720	48	58	20,5	2,83	2,1	2,8	2,1	0,8	1,5	4,4	177	10	148	0	1	87	0,29
	III	735	45	65	19,0	2,95	3,2	3,4	2,2	0,8	1,2	4,2	276	16	143	5	1	87	0,28
	IV	734	44	68	17,0	3,09	4,1	4,0	2,0	0,8	1,0	3,8	329	25	141	6	3	119	0,26
Puyallup	I	636	66	64	24,2	2,76	0,6	2,7	—	—	—	—	55	10	39	0	4	40	0,16
	II	655	62	73	22,0	2,88	1,7	3,3	2,4	0,7	1,4	4,5	74	10	41	0	3	47	0,18
	III	689	54	74	20,5	2,94	3,6	3,6	2,4	0,7	1,3	4,4	221	10	50	0	3	52	0,28
	IV	662	54	81	21,3	3,00	4,0	3,8	2,5	0,8	1,3	4,6	176	19	85	10	5	70	0,40
Zeva remontante	I	652	76	31	23,6	3,02	1,6	1,3	1,3	0,5	2,2	4,0	179	14	46	0	3	25	0,17
	II	673	70	33	21,4	3,14	2,8	1,5	1,6	0,5	1,7	3,8	189	14	113	0	1	95	0,20
	III	731	60	44	18,5	3,25	6,3	2,4	1,6	0,7	1,3	3,6	228	12	134	0	2	149	0,20
	IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	475	15	226	10	4	270	0,22
Heytor	I	671	64	34	20,1	2,87	1,1	1,7	1,5	0,5	2,3	4,3	—	—	—	—	—	—	—
	II	727	59	41	19,4	2,92	1,7	2,1	1,6	0,6	1,6	3,8	128	14	148	0	2	104	0,22
	III	777	57	45	17,0	3,01	2,7	2,6	1,8	0,9	1,1	3,8	215	35	210	10	5	134	0,22
	IV	793	51	47	14,9	3,12	2,5	3,1	1,5	1,5	0,7	3,7	413	50	200	16	8	333	0,20

extrêmes de maturité. La variété *Rose de Plombières* produit, par contre, peu de méthanol (6 mg/kg). Le méthanol libéré provient de la dégradation des pectines et son taux augmente surtout dans les fruits surmûris où la déméthylation est plus intense.

c) *Carbonyls totaux.*

C'est dans cette classe que se trouvent les composés caractéristiques de l'arôme de la framboise. Ceci a été mentionné par plusieurs auteurs. Ils représentent environ 50 p. 100 des produits volatils totaux. Bien que les teneurs varient suivant les variétés, le fruit surmûri contient généralement 2 à 3 fois plus de produits carbonylés que le fruit à véraison commençante. L'écart peut être très important suivant les variétés : *Puyallup* (50 mg/kg), *Schoenemann* (180 mg/kg).

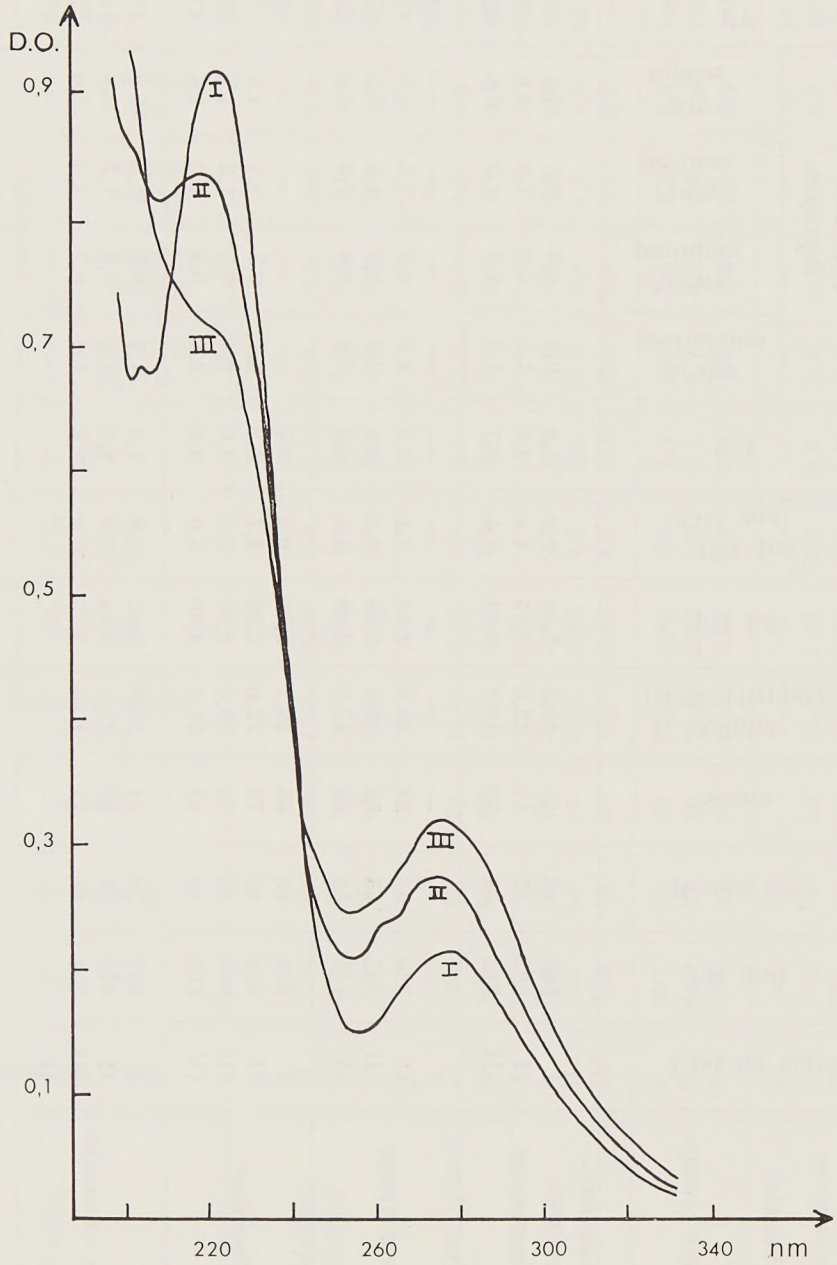


FIG. 1. — *Spectre U.V. des distillats de framboise à divers stades de maturité.*

d) *Acétate d'éthyle.*

C'est un composé mineur parmi les produits volatils de la framboise. Il apparaît essentiellement dans les fruits surmûris dont il est une caractéristique.

e) *Alcools supérieurs.*

Bien que présents dans toutes les variétés, ils constituent également une fraction mineure de l'arôme de framboise et leur concentration varie peu au cours de la maturation (quelques mg/kg).

Parmi les variétés étudiées, *Rose de Plombières* possède un parfum caractéristique, vraisemblabement dû à la présence d'alcools terpéniques (géraniol) déjà cités (NURSTEN et WILLIAMS, 1967). Bien que ces composés n'appartiennent pas aux alcools supérieurs au sens chimique, il nous a semblé utile de les mentionner ici.

f) *Éthanol.*

C'est, avec les carbonyls totaux, la fraction la plus importante des produits volatils. Il représente environ 50 p. 100 des produits volatils réducteurs. Il existe déjà à des doses appréciables (50 mg/kg environ) dans les fruits à véraison commençante. Dans les fruits sains, sa présence s'explique par une fermentation intracellulaire des sucres. Sa concentration augmente au cours de la maturation. Les fortes teneurs observées dans le fruit surmûri (200 mg/kg) peuvent être dues de façon complémentaire à une prolifération de levures sur le fruit lésé.

g) *Spectre UV des distillats.*

L'examen du spectre des distillats montre une augmentation de la densité optique à 275 nm et une diminution à 228 nm au cours de la maturation (fig. 1). Nous attribuons cette diminution à la disparition progressive de composés tels que l'hexénal qui seraient métabolisés (oxydation) au cours de la maturation. Le maximum à 275 nm peut être attribué à l'augmentation de la teneur en carbonyls totaux, ce qui est en accord avec les données de la littérature (absorption des composés cétoniques acycliques). Cette mesure peut être un indice intéressant pour suivre la maturation.

IV. — DISCUSSION

La maturation de la framboise se caractérise par l'accumulation rapide des sucres et des pigments colorés. Dans le même temps, la concentration en acides diminue. Le rendement en jus s'accroît, conséquence de la turgescence des fruits et de la dégradation des protopectines. La teneur en produits volatils réducteurs s'accroît considérablement. Elle est due essentiellement à la production, en parties sensiblement égales, d'éthanol et de produits carbonylés, ces derniers caractérisant l'arôme de framboise. Les diverses variétés étudiées se distinguent par leurs teneurs propres en produits fixes et volatils considérés et par leur vitesse d'évolution. Il faut souligner que ces résultats s'appliquent à une collection particulière et à un climat déterminé. En effet, les mêmes variétés cultivées en Anjou ne présentent pas les mêmes caractéristiques et, en général, elles sont moins sucrées et moins colo-

rées. Ceci est surtout marqué pour *Rose de Plombières* qui est bien adaptée en Bourgogne. De plus, cette variété est particulièrement appréciée pour son arôme et elle constitue une matière première de choix dans l'industrie des parfums et des cosmétiques.

La variété *Puyallup* présente une teneur en protopectines sensiblement constante au cours de sa maturation. Cette stabilité a déjà été signalée par SOUTY, PERRET et ANDRÉ (1967) pour d'autres fruits, comme les variétés de pêches *Pavies* appréciées pour leurs aptitudes à la conservation.

Reçu pour publication en mai 1971.

SUMMARY

COMPARISON OF FIXED AND VOLATILE COMPONENTS IN SEVERAL VARIETIES OF RASPBERRIES AT DIFFERENT STAGES OF RIPENESS

Composition of raspberries at different stages of maturity (from unripe to overripe) has been studied for 11 varieties grown by an experimental station in Burgundy. For this purpose we charted the evolution of fixed components (juice yield, insoluble parts, sugar, acidity, pH, pectic substances and color) and volatile components (total reducing volatils, methanol, ethanol, carbonyles, ethyl acetate, higher alcohols, UV spectra of distillate).

Rapid developpment of the fruit is marked by an accumulation of sugar (dextrose, levulose), by a drop in acidity (citric acid), by a breakdown of protopectines and by an increase in color. At the same time, the quantity of volatile reducing components increases considerably. They are made up of approximately equal parts of carbonyls and ethanol. The UV spectra of fruit distillates can be an index of ripeness.

RESUMEN

COMPARACION DE LOS PRODUCTOS FIJOS Y VOLATILES DE VARIEDADES DE FRAMBUESAS EN DIVERSAS ETAPAS DE MADURACION

La composición de las frambuesas en diversas etapas de su maduración (envero a sobremaduración) ha sido estudiada en once variedades plantadas en una propiedad experimental de Borgoña. Para ello, hemos seguido la evolución de los *productos fijos* (rendimiento en zumo y residuo insoluble en el agua, azúcares, acidez y pH, sustancias pécticas e intensidad de la coloración) y de los *productos volàtiles* (sustancias volátiles reductoras totales, metanol, etanol, productos carbonilos, acetato de etilo, alcoholes superiores y especto ultravioleta de los destilados). La evolución rápida del fruto queda señalada por la acumulación de azúcares (glucosa y fructosa), por la reducción de la acidez titulable (ácido cítrico), por la degradación de las protopectinas y por la intensificación de la coloración. En el mismo lapso de tiempo, el índice de productos volátiles reductores aumenta considerablemente. Los mismos están constituidos por fracciones virtualmente equivalentes, por productos carbonilos y por el etanol. El espectro ultravioleta de los destilados de frutos puede constituir un indicio de maduración.

RIASSUNTO

CONFRONTO TRA I PRODOTTI FISSI E VOLATILI DI VARIETA' DI LAMPONI A DIVERSI STADI DI MATURITA'

La composizione dei lamponi a diversi stadi di maturità (dall'invaiatura alla sovrammaturazione) è stata studiata su undici varietà piantate in un campo sperimentale in Borgogna. Per questo, abbiamo seguito l'evoluzione dei *prodotti fissi* (rendimento in succo e residuo insolubile

nell'acqua, zuccheri, acidità e pH, sostanze pectiche e intensità della colorazione) e dei *prodotti volatili* (sostanze volatili riduttrici totali, metanolo, etanolo, prodotti carbonilati, acetato d'etile, alcoli superiori, spettro UV dei distillati). L'evoluzione rapida del frutto è marcato dall' accumulazione degli zuccheri (glucosio e fruttosio), dalla degradazione delle protopectine e dall' intensificazione della colorazione. Nello stesso tempo, il tenore in prodotti volatili riduttori aumenta in modo considerevole. Essi sono costituiti in frazioni sensibilmente uguali da prodotti carbonilati e dall'etanolo. Lo spettro UV dei distillati di frutta puo' costituire un indice di maturità.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Boland F. E., Blomquist V. H., Estrin B., 1968. Chemical composition of fruits. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **51**, 1203-1209.

Bonnichsen R. K., Theorell H., 1951. An enzymatic method for the microdetermination of ethanol. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **3**, 58.

Bouzigues L., 1955. Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol par électrophotométrie. *Ann. Technol. agric.*, (2), 223-234.

Duclos J., Dupuy P., Lantin B., 1971. Étude agronomique et technologique de quelques variétés de Framboisiers. *Ann. Amélior. Plantes* (à paraître).

Eegriwe E., 1937. Reaktionen und Reagenzien zum Nachweis organischer Verbindungen. *Z. anal. Chem.*, **110**, 22.

Goddu R. F., Le Blanc N. F., Wright C. M., 1955. Colorimetric method for trace quantities of carboxylic esters. *Anal. Chem.*, **27**, 1251-1255.

Guimberteau G., 1960. Application de l'anthrone au dosage des sucres fermentescibles du vin. *Ann. Technol. agric.*, (1), 67-78.

Guymon J.-F., Nakagiri J., 1952. Cités par Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., 1958 : *Analyse et contrôle des vins*, 264-265, Librairie Polytechnique Béranger, Paris.

Haas G. J., Fleischman A. I., 1958. Use of the anthrone procedure in the carbohydrate analysis of beer. *Wallerstein Lab. Communic.*, **21**, 139-151.

Lappin G. R., Clark L. C., 1951. *Anal. Chem.*, **23**, 451-452 cité par Siggia S. 1963, in : *Quantitative organic analysis via functional groups*, 124-127, 3e édition, J. Wiley and Sons Inc., New York, London.

Leinbach L. R., Seegmiller C. G., Wilbur J. S., 1951. Composition of red raspberries, including pectin characterization. *Food Technol.*, **5**, 51-54.

Lenges J., Hinnekens H., Jacqmain D., Loncin M., Sacre J.-C., 1969. Influence de l'humidité relative d'équilibre sur les hydrolyses des substances pectiques. *Industr. aliment. agric.*, **86**, 1543-1550.

McComb E. A., McCready R. M., 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem.*, **24**, 1630-1632.

Monties B., Bidan P., 1967. Séparation des acides organiques par chromatographie en couche mince sur film. *Industr. aliment. agric.*, **84**, 347-349.

Nursten H. E., Williams A. A., 1967. Fruit aromas : a survey of components identified. *Chem. and Industry*, (12), 486-497.

Palluy E., Sundt E., Winter M., 1963. Analyse de l'arôme des framboises. Les acides et esters inférieurs. *Helv. chim. Acta*, **46** (255), 2297-2299.

Rouse A. H., Atkins C. D., 1955. Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the Citrus Univer. of Florida, Agric. exper. Stat.. *Techn. Bull.*, (570), 6-8.

Souty M., Perret A., André P., 1967. Premières observations sur quelques variétés de pêches destinées à la conserve. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 55-68.

Souty M., André P., Poggi A., 1969. Aptitudes de quelques variétés d'abricots à l'élaboration de fruits au sirop. I. Observations sur quelques particularités de la maturation au verger. *Industr. aliment. agric.*, **86**, 391-399.

Sundt E., Winter M., 1962. Analyse de l'arôme des framboises. Les alcools. *Helv. chim. Acta*, **45** (256), 2212-2218.

Tanner H., Brunner E. M., 1964. Enzymatische Bestimmung von Aethanol in der Getränken und Aromen. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **55**, 480.

Winter M., Palluy E., Hinder M., Willhalm B., 1962. Procédé d'isolement des constituants volatils de la fraise et de la framboise. *Helv. chim. Acta*, **45** (254), 2186-2195.

Winter M., Sundt E., 1962. Analyse de l'arôme des framboises. Les constituants carbonylés volatils. *Helv. chim. Acta*, **45** (255), 2195-2211.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 153-165.

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN ŒUF DES PATES ALIMENTAIRES

II. — Séparation électrophorétique et dosage de protéines spécifiques

K. KOBREHEL et P. FEILLET

Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz,
Centre de Recherches, I. N. R. A.,
34 - Montpellier

RÉSUMÉ

On propose deux nouvelles méthodes de détermination de la teneur en œuf des pâtes alimentaires basées sur le dosage électrophorétique en gel de polyacrylamide (pH = 3,2) de protéines spécifiques de l'œuf; la première permet de déterminer la teneur en blanc et la seconde la teneur en jaune.

Mots clés : *œufs, pâtes alimentaires, blés durs, protéines, ovalbumines.*

INTRODUCTION

Nous avons exposé dans un mémoire précédent (Kobrehel, 1971) certaines des possibilités offertes par le dosage des constituants lipidiques des pâtes alimentaires pour apprécier leur teneur en œuf. Bien qu'adaptées au contrôle de fabrication, les méthodes que nous avons proposées ne peuvent guère être retenues pour mettre en évidence des fraudes éventuelles en raison des possibilités d'adultération par adjonction de lipides. De plus, seul le jaune d'œuf est ainsi dosé, à l'exclusion du blanc.

Certains auteurs ont proposé d'apprécier la teneur en blanc d'œuf par dosage des protéines solubles des pâtes (Hadorn et Jungkunz, 1952 ; Alliot, 1958 ; Hadorn et Zürcher, 1965) ou par détermination de la teneur en une protéine du blanc d'œuf préalablement séparée par électrophorèse en milieu basique (Silano *et al.*, 1968).

Dans le présent travail, nous proposons deux nouvelles méthodes électrophorétiques, complémentaires l'une de l'autre, la première dosant spécifiquement le blanc d'œuf, la deuxième le jaune. Une étude faite sur des pâtes du commerce nous a permis de comparer les résultats ainsi obtenus à ceux que fournissent le dosage des lipides totaux (Kobrehel, 1971), des acides gras (Kobrehel, 1971) et du cholestérol (Alliot, 1958 ; Lecoq, 1965).

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Nature des échantillons étudiés*

Les *semoules, œufs* et *pâtes aux œufs fabriquées au laboratoire* sont identiques aux échantillons utilisés dans le mémoire précédent (KOBREHEL, 1971).

Pâtes aux œufs du commerce.

Des pâtes de quatre marques différentes ont été étudiées (P_1, P_2, P_3, P_4). Chacune d'elles portait la dénomination « Pâte aux œufs frais ».

B. — *Prise de l'échantillon*

Suivant les conditions déjà décrites (KOBREHEL, 1971).

C. — *Extraction des protéines solubles*

Protéines du blanc d'œuf.

Les protéines du blanc d'œuf sont solubilisées dans un tampon lactate d'aluminium 0,0085 M (pH = 3,2) préparé de la manière suivante : 400 g de lactate d'aluminium sont versés dans 5 litres d'eau désionisée ; on ajoute 5,6 moles d'acide lactique. La solution est agitée de temps en temps pendant 72 heures, puis filtrée. On amène la solution à 8 litres exactement. Le tampon concentré ainsi obtenu est dilué 20 fois avant emploi (NIMMO, 1968).

Une prise d'essai de 1 g de pâtes broyées est mise en suspension dans 20 ml de tampon lactate d'aluminium contenant 0,3 mg de lysozyme par millilitre. Après une heure de contact à température ordinaire, la suspension est centrifugée 1 heure à 16 000 tours/mn (ou filtrée sur filtre « Millipore » 0,45 μ). On conserve le surnageant.

Protéines du jaune d'œuf.

Une prise d'essai de 2 g de produit est successivement extraite par 30 ml d'éthanol 60 p. 100 (v/v), puis par 30 ml d'eau désionisée. Les conditions des deux extractions sont identiques : contact de 30 minutes avec le solvant et centrifugation de 10 mn à 16 000 tours/mn.

Le résidu insoluble est repris par 1 ml d'acétate de sodium 0,1 M après que l'intérieur du tube de centrifugeuse ait été soigneusement essuyé. On centrifuge 1 heure à 16 000 tours/mn après une heure de contact. On garde le surnageant.

D. — *Électrophorèse*

La séparation électrophorétique est effectuée en gel de polyacrylamide préparé suivant NIMMO *et al.* (1963) (gel à 8 p. 100 de 14,5 cm de large et 6 mm d'épaisseur, polymérisé dans l'eau puis équilibré une nuit dans le tampon lactate d'aluminium utilisé pour l'extraction).

Les dépôts sont de 50 μl. Les protéines du blanc sont soumises à un champ électrique de 8 V/cm pendant 3 heures (environ 60 mA) et celle du jaune à un champ de 7 V/cm pendant 2 heures 20 mn.

E. — *Coloration des protéines*

Après séparation électrophorétique, les gels sont immergés 30 minutes dans une solution d'amidoschwartz 10 B (solution à 1 p. 100 dans le mélange méthanol/eau/acide acétique, 45/45/10, v/v/v, filtrée avant usage), puis lavés 48 heures dans une solution d'acide acétique 5 p. 100 régénérée par circulation continue à travers du charbon végétal actif. Il est possible de décolorer les gels en 30 minutes par migration électrique du colorant à travers l'épaisseur du gel.

F. — *Détermination de la teneur en blanc d'œuf*

La méthode de calcul, illustrée par la figure 1, repose sur la détermination de la concentration d'une protéine *a* caractéristique du blanc d'œuf.

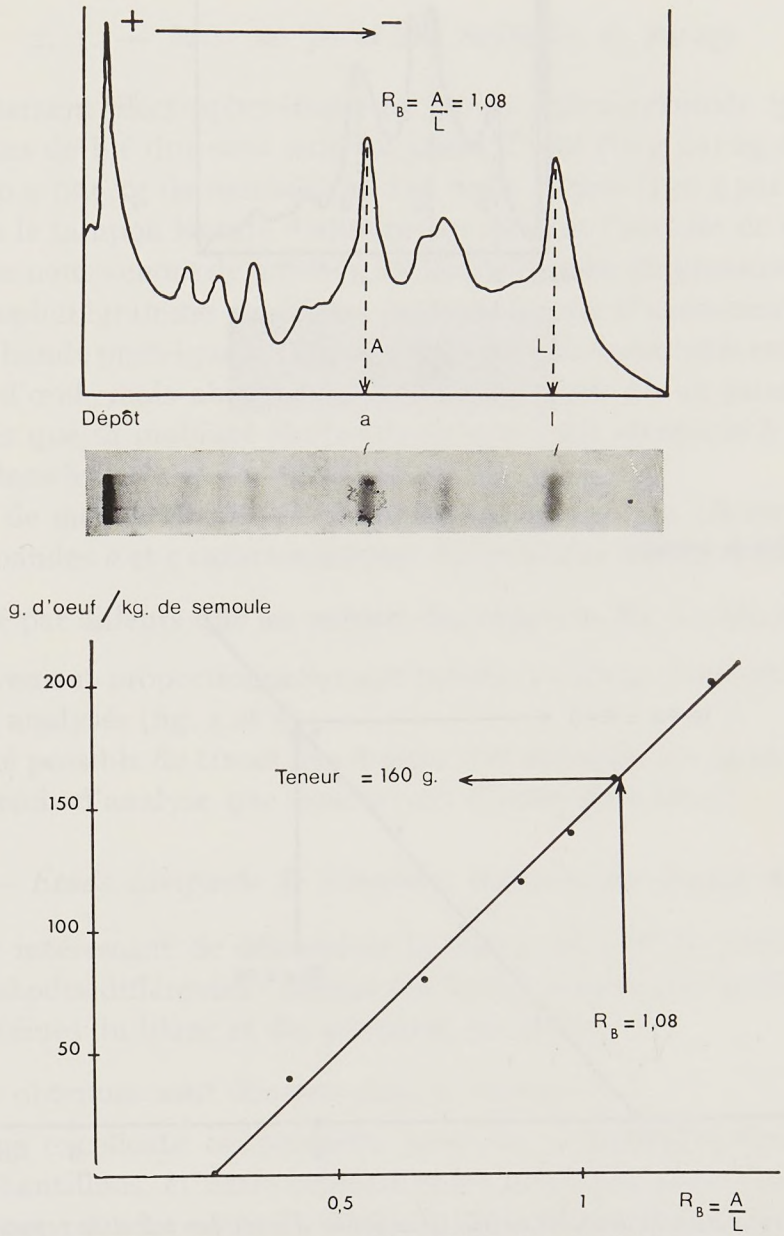


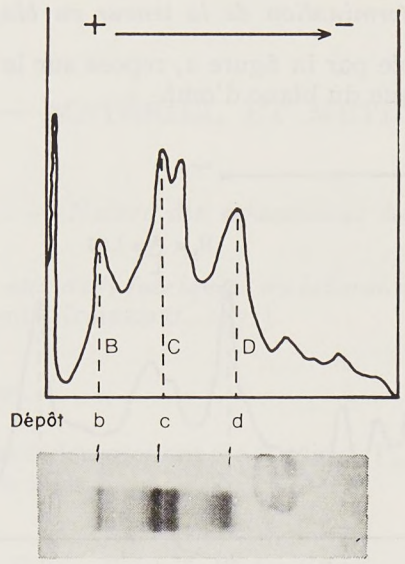
FIG. 1. — *Détermination de la teneur en œuf (et en blanc d'œuf) par dosage densitométrique de la fraction « a » par référence au lysozyme témoin « l » après fractionnement électrophorétique en gel de polyacrylamide d'un extrait lactate d'aluminium* (pH = 3,2)

Après dépouillement densitométrique de l'électrophorégramme (appareil Vernon, filtre n° 22) on mesure les hauteurs respectives A et L des pics *a* et *l* (lysosyme témoin). De la valeur du rapport $R_B = A/L$, on déduit graphiquement, après étalonnage préalable, la teneur en blanc d'œuf (ou en œuf) de l'échantillon inconnu.

A défaut de densitométrie, il est possible d'apprécier la teneur en œuf par simple observation visuelle, comparativement à des témoins.

G. — *Détermination de la teneur en jaune d'œuf*

La teneur en jaune d'œuf est déterminée par une méthode très voisine après calcul du rapport $R_J = \frac{B + C}{D}$ où B, C et D sont respectivement les hauteurs des pics correspondant aux protéines *b* et *c* du jaune d'œuf et *d* de la semoule (fig. 2).



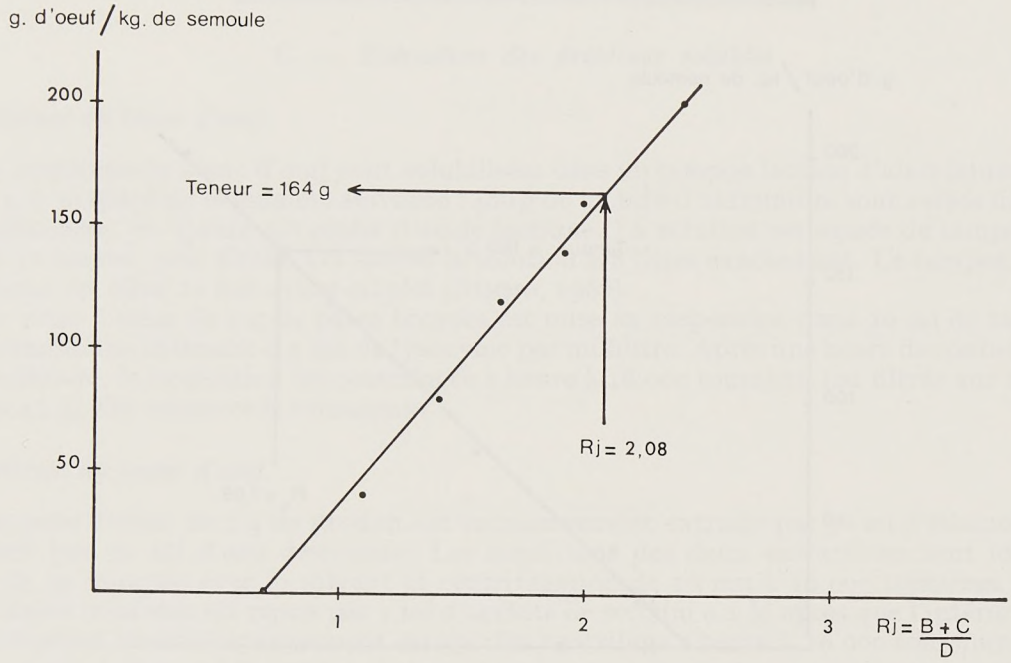


FIG. 2. — *Détermination de la teneur en œuf (et en jaune d'œuf) par calcul du rapport* $R_J = \frac{B+C}{D}$ *après fractionnement électrophorétique des fractions solubles dans l'acétate de sodium* 0,1 *M* (après extraction par l'éthanol 60 p. 100 et par l'eau)

H. — *Dosage des lipides totaux et des acides gras*

Dans les conditions déjà décrites (KOBREHEL, 1971).

I. — *Dosage du cholestérol*

On utilise la méthode colorimétrique de MACHEBOEUF et DELSAL (1942). Les lipides extraits par la méthode azéotropique (KAHANE et REGORD, 1964) sont saponifiés. L'insaponifiable est dissous dans 3,5 ml de chloroforme. La solution est additionnée de 3,5 ml d'anhydride acétique et deux gouttes d'acide sulfurique concentré. La coloration (réaction de Libermann-Burchard) se développe en 30 minutes à 21°C et à l'obscurité. La lecture s'effectue au spectrophotomètre à 680 nm.

II. — RÉSULTATS

2. 1. — *Mise au point des méthodes de dosage*

Le comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide (pH = 3,2) des protéines de pâtes de blé dur sans œuf, au jaune d'œuf (60 g par kg de semoule), au blanc d'œuf (100 g par kg de semoule) et aux œufs entiers (140 g par kg de semoule) solubilisées dans le tampon lactate d'aluminium ou dans l'acétate de sodium suivant les conditions que nous venons de préciser, est illustré par les diagrammes de la figure 3.

Sur l'électrophorégramme supérieur (extrait lactate d'aluminium), on constate l'existence de la bande protéique *a*, présente dans les pâtes aux œufs entiers et dans les pâtes au blanc d'œuf, mais absente des pâtes sans œufs ou au jaune d'œuf ; nous avons pu vérifier que sa mobilité électrophorétique était identique à celle de l'ovalbumine traitée dans les mêmes conditions.

On détecte de même dans les extraits acétate de sodium (électrophorégramme inférieur) deux bandes *b* et *c* caractéristiques des produits contenant du jaune d'œuf.

On a vérifié par ailleurs que les valeurs des rapports $R_B = A/L$ et $R_J = \frac{B + C}{D}$ étaient respectivement proportionnelles aux teneurs en blanc d'œuf et en jaune d'œuf des échantillons analysés (fig. 4 et 5).

Il a donc été possible de tracer des droites d'étalonnage (fig. 1 et 2) et de définir les protocoles précis d'analyse que nous avons décrits plus haut.

2. 2. — *Étude comparée de plusieurs méthodes de dosage des œufs*

Il a semblé intéressant de déterminer la teneur en œuf de pâtes du commerce à l'aide de 5 méthodes différentes : dosage des lipides totaux, des acides gras, du cholestérol, des protéines du blanc et des protéines du jaune.

Les valeurs obtenues sont données dans le tableau 1 :

On note une excellente concordance entre les 2 méthodes électrophorétiques pour tous les échantillons, et entre celles-ci et les méthodes basées sur le dosage des fractions lipidiques pour les pâtes P_3. Pour les échantillons P_2 et P_4, les dosages des protéines caractéristiques conduisent à des résultats un peu plus faibles. L'échantillon P_1, enfin, a un comportement anormal au niveau des composants lipidiques, la teneur en acide oléique étant spécialement élevée comparativement à la teneur en lipides totaux.

On remarquera enfin sur la figure 6 qu'il aurait été possible de classer les échantillons sans erreur appréciable par simple observation des diagrammes.

III. — DISCUSSION

Ainsi qu'il ressort des résultats précédents, les deux méthodes que nous proposons permettent de doser la teneur en blanc et en jaune d'œuf des pâtes alimentaires.

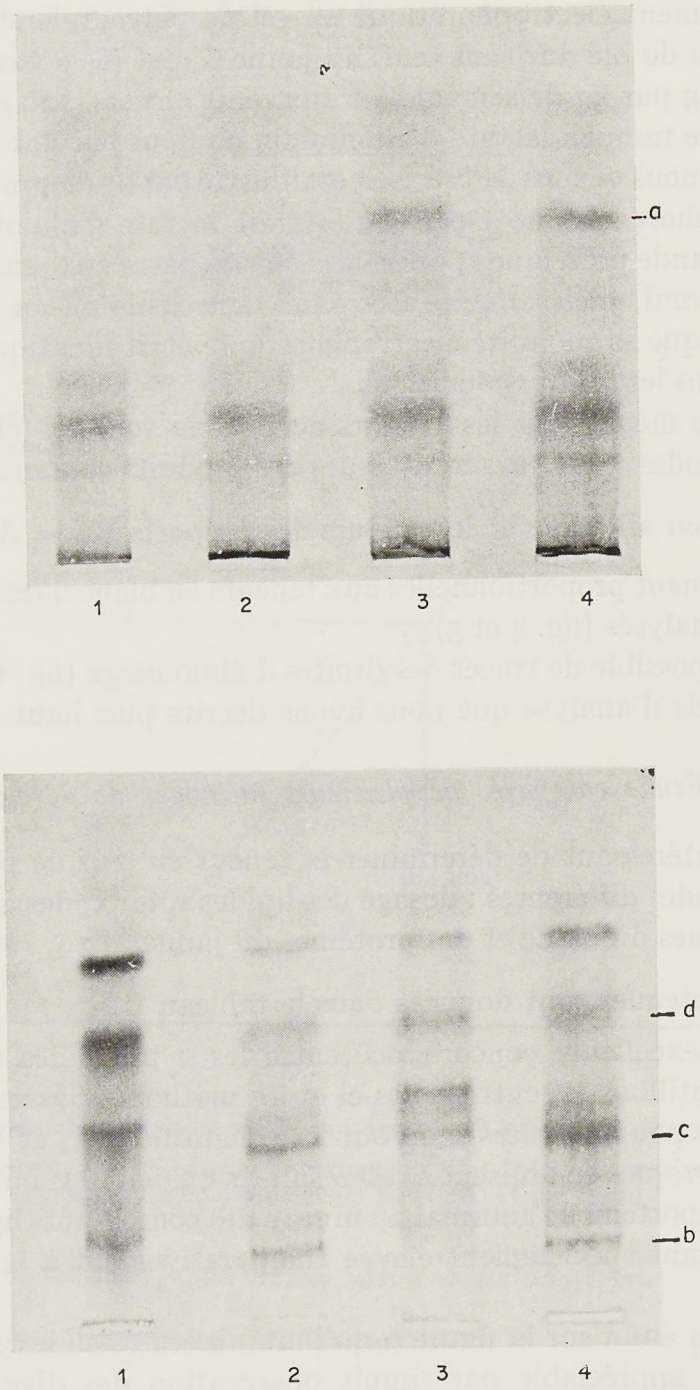


FIG. 3. — *Comportement électrophorétique* (gel de polyacrylamide 8 p. 100, pH = 3,2) *d'extraits lactate d'aluminium* (photo supérieure) *ou acétate de sodium* (photo inférieure) *de pâtes de blés durs sans œufs* (1), *au jaune d'œuf* (2), *au blanc d'œuf* (3) *et aux œufs entiers* (4)

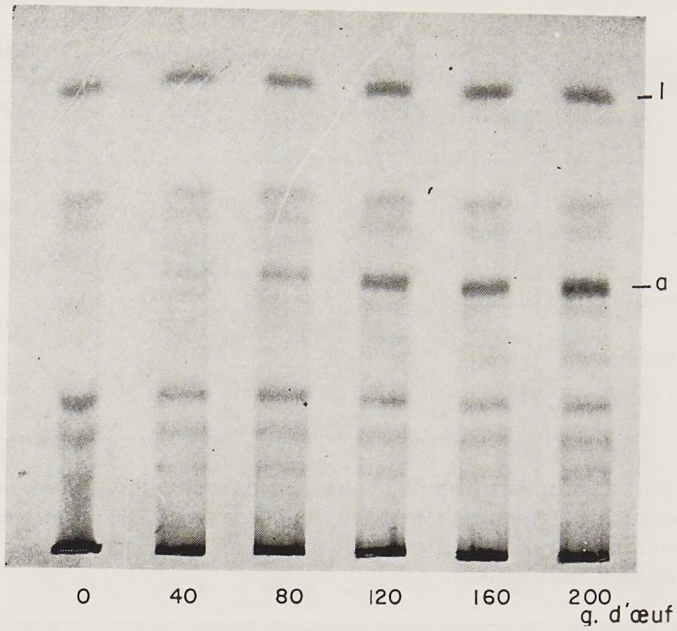


FIG. 4. — *Comportement électrophorétique des pâtes contenant de 0 à 200 g d'œufs par kg de semoule*
Valeurs du rapport A/L: 0,25 ; 0,40 ; 0,68 ; 0,87 ; 1,08 ; 1,28 ; (Gel de polyacrylamide 8 p. 100-pH = 3,2 ; extrait lactate d'aluminium à 0,3 mg lysozyme par ml). *a* : protéine de blanc d'œuf ; l : lysozyme.

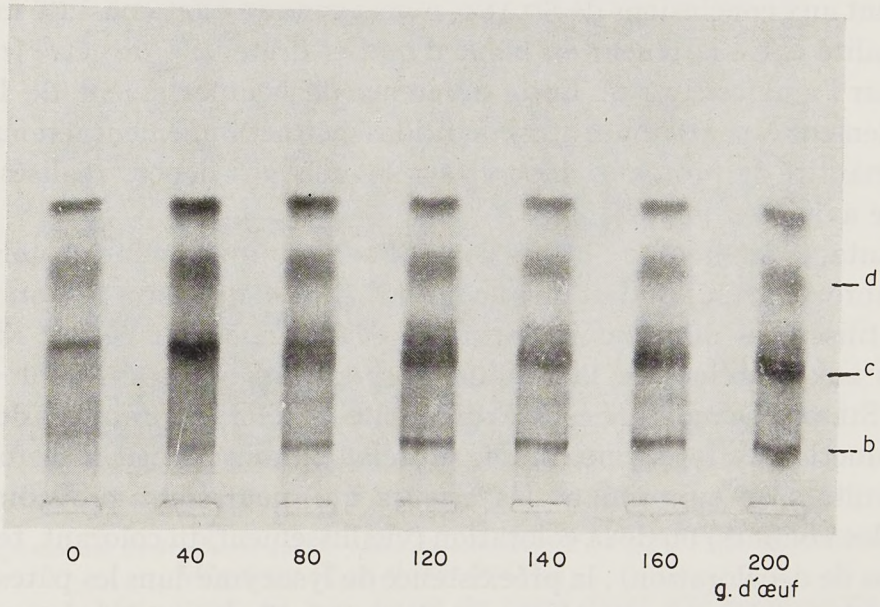


FIG. 5. — *Comportement électrophorétique de pâtes contenant de 0 à 200 g d'œufs par kg de semoule*
Valeur du rapport (B + C)/D : 0,70 ; 1,1 ; 1,4 ; 1, 66 ; 1,92 ; 2,0 ; 2,4. (Gel de polyacrylamide- 8 p. 100 -pH = 3,2 ; extrait acétate de sodium). *b* et *c* : protéines du jaune d'œuf ; *d* : protéine de la semoule.

TABLEAU I

Détermination de la teneur en œuf de pâtes du commerce par cinq méthodes de dosages différentes

Méthodes de dosage utilisées	Teneur en œuf des pâtes (g d'œuf frais/kg de semoule)			
	P_1	P_2	P_3	P_4
Lipides totaux	156	144	190	135
Acides gras (18 + 18 : 1)	190	147	190	125
Cholestérol *	121-131	132-142	204-214	136-146
Électrophorèse des protéines du blanc d'œuf	140	130	198	115
Électrophorèse des protéines du jaune d'œuf	150	130	206	108

* Teneurs calculées par la formule : (mg de cholestérol dans 100 g de pâtes — a) × 2 où « a » est un coefficient qui correspondrait à la teneur en sitostérols de la semoule. Les premières données sont calculées d'après $a = 35$, valeur retenue par HADORN et JUNGKUNZ (1952), les deuxièmes d'après $a = 30$, coefficient préconisé par CUSTOT et LASNE (1960).

a — *Dosage du blanc d'œuf*

La méthode de dosage du blanc d'œuf se différencie principalement de celle de SILANO *et al.* (1968) par les deux points suivants : on pratique l'électrophorèse en plaque de polyacrylamide (SILANO effectue ses séparations par électrophorèse en disque) ; la bande spécifique du blanc d'œuf utilisée pour le dosage est l'ovalbumine. Contrairement aux conclusions de SILANO, nous avons en effet constaté une excellente proportionnalité entre la teneur en blanc d'œuf et l'intensité de cette fraction après coloration par l'amidoschwartz. Cette différence de comportement de l'ovalbumine doit probablement être attribuée aux conditions de fractionnement retenues et notamment à la quantité de protéines déposée sur les gels, les dépôts réalisés par SILANO étant à notre avis trop importants.

Les avantages inhérents à l'utilisation de l'ovalbumine comme protéine spécifique sont au nombre de deux : du fait de sa concentration élevée dans le blanc d'œuf, il est possible d'utiliser des dilutions importantes et d'atténuer de ce fait l'intensité des bandes dues aux protéines de la semoule ; par ailleurs, contrairement à la fraction retenue par SILANO, sa mobilité est très différente de celle des protéines du blé.

L'introduction du lysozyme comme protéine témoin permet d'accroître la précision des résultats en supprimant les erreurs qui pourraient provenir des dépôts (erreurs sur les volumes) ou de la coloration (vieillissement du colorant, temps de coloration, temps de décoloration) ; la préexistence de lysozyme dans les pâtes aux œufs ne modifie guère la précision des résultats en raison de la disproportion entre les quantités présentes et les quantités ajoutées. Si la teneur en œuf augmente de 10 g d'œuf par 1 kg de semoule, la teneur de l'extrait en lysozyme n'augmente en effet que de 0,0013 mg/ml. Il reste de toute manière souhaitable d'introduire un échantillon témoin à chaque essai ; cela est même indispensable si on se limite à une appréciation visuelle des concentrations.

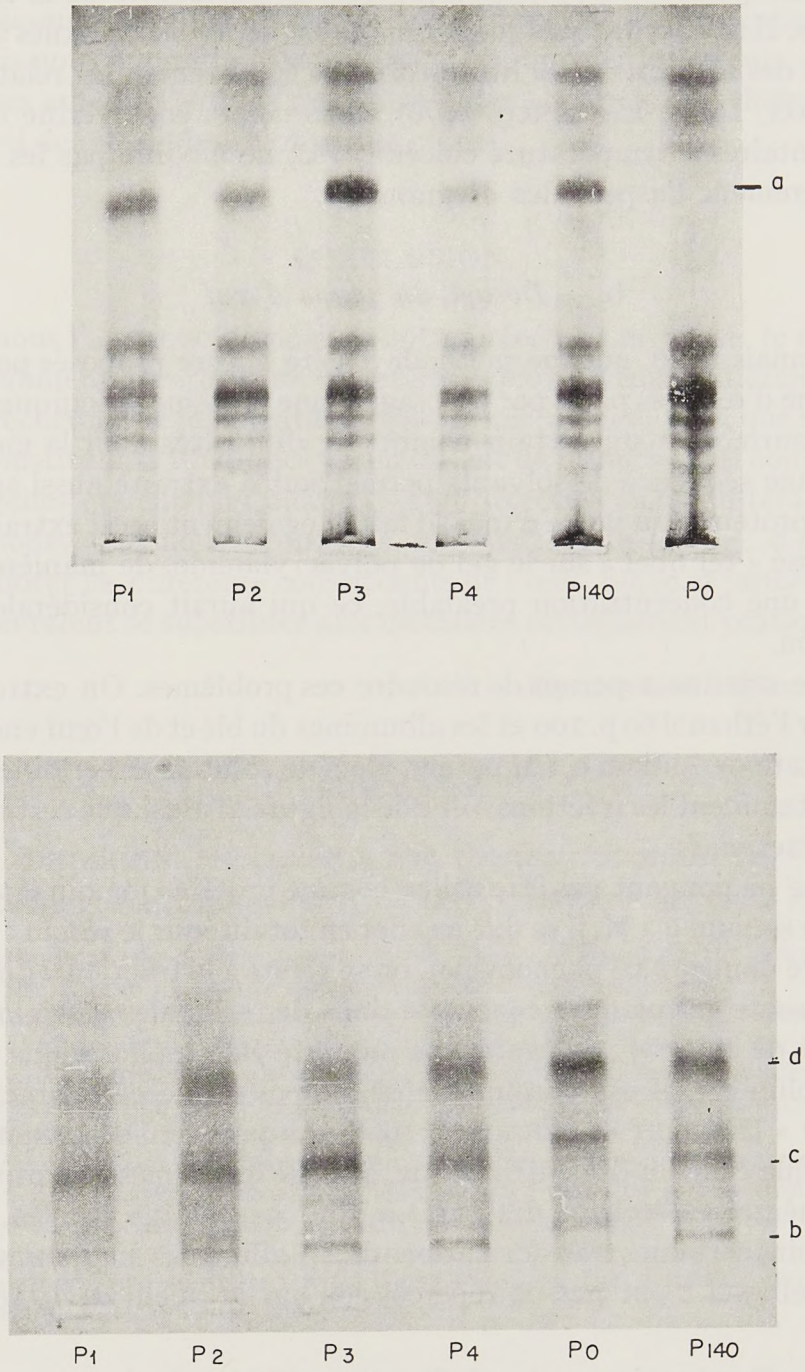


FIG. 6. — *Comportement électrophorétique de pâtes du commerce P_1, P_2, P_3, P_4 comparativement à une pâte à 140g d'œuf* (P_{140}) *et sans œuf* (P_0)

En haut : dosage du blanc d'œuf ; en bas : dosage du jaune d'œuf. (Gel de polyacrylamide : 8 p. 100 ; tampon lactate d'aluminium). *a* : protéine du blanc d'œuf. *b* et *c* : protéines du jaune d'œuf. *d* : protéine de la semoule.

La validité des résultats repose sur la précision du dosage et sur l'importance des fluctuations de la teneur en ovalbumine des œufs.

En ce qui concerne le premier point, et ainsi qu'on peut le calculer à partir des résultats de la figure 3, la teneur en œuf est obtenue avec une erreur maximum de ± 10g.

Nous n'avons pas étudié systématiquement la variabilité de la teneur en ovalbumine des œufs. Il ressort des quelques essais que nous avons effectués à partir d'œufs du commerce et des résultats de la littérature que cette teneur est relativement constante (PARKINSON, 1966 ; LECLERCQ, 1970). Mais nous avons vérifié que le séchage des pâtes alimentaires à température élevée (70°C) ne modifie pas les résultats bien qu'il altère légèrement l'aspect des diagrammes.

b — *Dosage du jaune d'œuf*

A notre connaissance, aucune méthode n'a été encore proposée pour déterminer la teneur en jaune d'œuf des pâtes par le dosage d'une protéine spécifique. Pour ce faire, nous avons dû surmonter un certain nombre de difficultés dont la moindre n'a pas été de trouver une séquence de solvants permettant d'extraire aussi spécifiquement que possible les protéines du jaune d'œuf ; il fallait également que l'extrait final obtenu puisse être déposé « tel quel » sur le gel de polyacrylamide, de manière à éviter une purification ou une concentration préalable, ce qui aurait considéralement allongé l'expérimentation.

La méthode retenue a permis de résoudre ces problèmes. On extrait la majorité des gliadines par l'éthanol 60 p. 100 et les albumines du blé et de l'œuf encore présentes par l'eau ; l'acétate de sodium 0,1 M permet alors de solubiliser certaines protéines du jaune d'œuf (notamment les fractions *b* et *c* de la figure 2) ainsi que certaines protéines de la semoule (fraction *d*).

Le lysozyme ne pouvant pas être utilisé comme protéine témoin (ajouté à la solution d'acétate de sodium 0,1 M, il se fixe en effet en totalité sur le résidu ; aucune explication n'a pu être donnée à ce phénomène), on se réfère à la fraction *d* dont on a vérifié qu'elle était présente en quantité constante dans des semoules d'origines différentes (variétés et lieux de culture) ; eu égard à sa mobilité électrophorétique et à ses caractéristiques de solubilité, il est raisonnable de supposer que cette fraction *d* est de type « globuline » (FEILLET et BOURDET, 1968). La précision de la méthode, qui est de même ordre que celle du dosage du blanc, appelle les mêmes remarques que précédemment. De même, un séchage des pâtes à 70°C ne modifie pas les résultats ; on constate néanmoins certaines transformations dans l'allure des diagrammes électrophorétiques, mais celles-ci n'ont pas de répercussion sur le calcul de la teneur en œuf.

c — *Comparaison entre différentes méthodes de dosage*

Comparativement aux méthodes reposant sur la détection et le dosage des constituants lipidiques tels que les lipides totaux, certains acides gras ou le cholestérol (tabl. 1), les deux nouvelles méthodes que nous proposons présentent des avantages certains : dosage de la teneur en blanc et en jaune d'œuf, simplicité et rapidité de mise en œuvre, possibilité d'effectuer de nombreuses analyses simultanées, matériel peu coûteux, bonne reproductibilité des résultats.

L'utilisation de ces méthodes rend les falsifications pratiquement impossibles,

car on voit mal comment il serait possible d'introduire, à faible prix, des protéines de mobilité identique à celles qui ont été retenues pour effectuer le dosage. Nous savons que ce n'est pas le cas des lipides totaux, des acides gras ou même du cholestérol. La pâte du commerce P1 semble d'ailleurs correspondre à un cas typique de falsification par introduction de lipides étrangers.

La méthode au cholestérol présente certes de nombreux avantages sur le plan analytique, mais nous avons déjà eu l'occasion de rappeler les erreurs éventuellement importantes dues aux fluctuations rencontrées dans la teneur en cholestérol des œufs et en phytostérol des semoules (KOBREHEL, 1971).

CONCLUSION

Ainsi que nous l'avons souligné dans notre précédent mémoire, le dosage des œufs dans les pâtes alimentaires présente un intérêt à deux niveaux différents : contrôle de la fabrication, recherche de falsification. Nous avions alors montré que si les méthodes de dosage des constituants lipidiques permettaient de résoudre très convenablement le premier point, elles étaient mal adaptées à la détection des adultérations. Les deux nouvelles méthodes que nous proposons comblent cette lacune, d'autant qu'elles permettent de doser les différents constituants de l'œuf, blanc et jaune. Nous pensons donc qu'elles devraient se substituer aux méthodes actuellement pratiquées.

Reçu pour publication en juin 1971.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE EGG CONTENT OF NOODLES.

II. — ELECTROPHORETIC SEPARATION AND DOSAGE OF SPECIFIC PROTEINS.

Two new methods of egg dosage are proposed. They are based on the electrophoretic separation of specific proteins of egg white and yolk in a polyacrylamide gel.

The egg white content is determined in the following way : 1 g of pulverized noodles is suspended in 20 ml of aluminium lactate buffer containing 0,3 mg lysozyme per ml ; the proteins rendered soluble are separated by electrophoresis in aluminium lactate buffer. The egg white content of the concentration of an egg protein, determined by densitometry compared with the lysozyme concentration, is deduced.

Yolk dosage is carried out by electrophoretic separation of the soluble fraction in 1 ml sodium acetate 0.1 M of 2 g of noodles previously treated with 30 ml of 60 p. 100 ethanol and 30 ml of water ; the degree of the concentration of two yolk proteins comparative to a semolina protein gives the yolk content.

These two methods are compared with those based on the detection and dosage of lipid constituents (total lipids, fatty acids, cholesterol).

RESUMEN

DETERMINACION DEL CONTENIDO EN HUEVO DE LAS PASTAS ALIMENTICIAS

II. — SEPARACION ELECTROFORETICA Y DOSIFICACION DE LAS PROTEINAS ESPECIFICAS

Se proponen dos nuevos métodos de dosification de los huevos. fundados en la separacion electroforética en forma de gel de poliacrilamida de proteinas específicas de la clara y de la yema.

El contenido en clara de huevo es determinado de la forma siguiente : 1 g de pastas molidas

es puesto en suspensión en 20 ml de tampón lactato de aluminio que contiene 0,3 mg de lisozima por ml. Las proteinas solubilizadas quedan separadas por electrofóresis en tampón lactato de aluminio. Se deduce el contenido en clara de la concentración en una proteina del huevo determinada por densitometriá, comparativemente a la concentración en lisozima.

La dosificación de la yema de huevo se lleva a cabo por separación electroforética de la fracción soluble en 1 ml de acetado de sodio 0,1 M de 2 g de pastas previamente tratadas por 30 ml de etanol, a razón de 6 p. 100 y 30 ml de agua. El valor de la concentración en dos proteinas de yema comparativamente a una proteina de la sémola, permite determinar el contenido en yema.

Se comparan estos dos métodos con aquellos fundados en la detección y la dosificacion de componentes lipídicos (lípidos totales, ácidos grasos, colesterol).

RIASSUNTO

DETERMINAZIONE DEL TENORE IN UOVO NELLE PASTE ALIMENTARI.

II. SEPARAZIONE PER ELETTROFORESI E DOSATURA DELLE PROTEINE SPECIFICHE.

Sono proposti due nuovi metodi di dosatura della uova, basati sulla separazione per elettroforesi in gelo di poliacrilamide di proteine specifiche della chiara e del tuorlo.

Il tenore in chiara dell'uovo è determinato nel modo seguente : 1 g di paste macinate è messo in sospensione in 20 ml di tampone lattato d'alluminio contenente 0,3 mg di lisozima per ml; le proteine solubilizzate sono separate per electtroforesi in tampone lattato d'alluminio. Facendo il raffronto con la concentrazione in lisozima, si deduce il tenore in chiara della concentrazione in una proteina dell'uovo determinata per densitometria.

La dosatura del tuorlo avviene mediante separazione per elettroforesi della frazione solubile in 1 ml d'acetato di sodio 0,1 M di 2 g di paste previamente trattate con 30 ml d'etanolo a 60 p. 100 d'acqua e 30 ml d'acqua ; il valore della concentrazione in due proteine del tuorlo comparativamente a una proteina della semola consente di determinare il tenore in tuorlo.

Questi due metodi sono paragonati a quelli basati sulla rivelazione e dosatura dei costituenti lipidici (lipidi totali, acidi grassi, colesterolo).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alliot M,. 1958. Sur l'analyse des pâtes alimentaires aux œufs. *Ann. Falsif. Fraudes*, (594-596), 151-157.

Custot F., Lasne H., 1960. La teneur en œufs des pâtes aux œufs du commerce. Quelques résultats analytiques. *Ann. Falsif. Fraudes*, (619), 400-403.

Feillet P., Bourdet A., 1968. Les protéines solubles du blé. I. Isolement et caractérisation des albumines et des globulines. *Ann. Technol. agric.*, **17**, (3), 217-225.

Hadorn H., Jungkunz R., 1952. Beitrag zur Bestimmung des Eigehaltes von Eierteigwaren. *Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg.*, **43** (1), 1-49.

Hadorn H., Zürcher K., 1965. Beitrag zur Bestimmung des Eigehaltes in Teigwaren Berechnung von Eiklar und Eigelb. *Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg.*, **56** (2), 71-76.

Kahane E., Regord M. T., 1964. Sur l'extraction des lipides. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **18** (2), 1-21.

Kobrehel K., 1971. Détermination de la teneur en œuf des pâtes alimentaires. I. Par analyse de la fraction lipidique : dosages des lipides, de la choline et des acides gras. *Ann. Technol. agric.*, **20** (1), 75-87.

Leclercq B., 1970. Facteurs nutritionnels modifiant le poids de l'œuf et de ses constituants. *Ann. Biol. anim., Biochim. Biophys.*, **10** (2), 239-252.

Lecoq R., 1965. *Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles*. vol. 2, 1474-1482. Doin, Paris.

Machebœuf M., Delsal J., 1942. Recherche sur le dosage colorimétrique de petites quantités de cholestérol libre ou estérifié. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **24** (10-12), 296-309.

Nimmo C., 1968. (Communication personnelle.)

NIMMO C., O'SULLIVAN T., MOHAMMAD A., PENCE W., 1963. Fractionation and zone electrophores si of proteins of water soluble materials of flour. *Cereal Chem.*, **40**, 390-398.

PARKINSON R. L., 1966. The chemical composition of eggs. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 101-111.

SILANO V., D'ERRICO A. M., MICCO, C., MUNTONI F., POCCHIARI F., 1968. Egg content of noodles by quantitative analysis of characteristic proteins of the egg. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **51** (6), 1213-1216s

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 167-178.

LA MATURATION DE LA VIANDE. ÉVOLUTION *POST-MORTEM* DE LA TENDRETÉ ET TRANSFORMATIONS BIOCHIMIQUES DES PROTÉINES MYOFIBRILLAIRES

C. VALIN et A. PINKAS *

avec la collaboration technique de A. Obled

Station de Recherches sur la Viande,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,
Theix, 63 - Saint-Genès-Champanelle

RÉSUMÉ

La tendreté de la viande est fonction des propriétés de deux constituants du muscle, le tissu conjonctif et l'appareil contractile. *Post mortem*, la tendreté de la viande augmente. L'analyse physique du gain de tendreté *post mortem* indique que la force et le travail de cisaillement diminuent au cours de la maturation ainsi que la résistance à la compression du muscle. Parallèlement l'examen biochimique des transformations subies par les protéines myofibrillaires au cours de la même période montre que l'évolution qualitative et quantitative de la solubilité de ces fractions est provoquée dans une large mesure par la perte des propriétés de stabilisation de la strie Z sur les filaments d'actine. Plus les transformations myofibrillaires sont importantes, plus la résistance à la compression du muscle diminue.

Mots clés : *viande, maturation, protéines myofibrillaires.*

INTRODUCTION

La maturation de la viande se traduit pratiquement par une variation considérable de la tendreté du muscle dans les jours qui suivent l'abattage.

Deux fractions protéiques jouent un rôle prépondérant dans le déterminisme de la tendreté : d'une part les protéines du tissu conjonctif, d'autre part les protéines myofibrillaires. Au cours de la maturation il n'a pas été possible, jusqu'à ce jour, de mettre en évidence une évolution des composants du tissu conjonctif, et de ce

* Adresse actuelle : Research Institute of animal Husbandry, Kostinbrod, Sofia (Bulgarie).

fait les augmentations de tendreté enregistrées ont été imputées à des modifications de l'organisation des protéines myofibrillaires. Mais, selon les différents auteurs, plusieurs explications du phénomène ont été proposées : tout d'abord une destruction des liens établis au cours de l'installation de la *rigor mortis* entre l'actine et la myosine (FUJIMAKI, 1965 ; SOLOVIEV, 1966), ou bien une attaque et une altération des molécules de myosine par les protéases intracellulaires (GUNTHER, 1969), et enfin une destruction plus ou moins complète de la strie Z et des liaisons des filaments d'actine à la strie Z (VALIN, 1967, 1968 ; PENNY, 1968, 1970 ; FUKAZAWA et YASUI, 1968 ; DAVEY et DICKSON, 1970).

Le but du présent travail a été d'étudier parallèlement l'évolution de quelques caractéristiques mécaniques du muscle au cours de la maturation et les transformations qui se produisent au niveau de l'organisation myofibrillaire.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'étude a porté sur des bœufs de 24 à 30 mois de races diverses. Le muscle utilisé était le muscle *Rectus abdominis* prélevé 1 jour et 8 jours après l'abattage ; les carcasses ont été conservées à + 4°C.

1. — *Extraction des protéines myofibrillaires*

Les extractions ont été opérées dans trois milieux différents :

— la solution de Weber Edsall (WE) : KCl 0,6 M, Na_2CO_3 0,01 M, $NaHCO_3$ 0,04 M ;

— une solution de phosphate bipotassique (Ph) : K_2HPO_4 0,266 M ;

— la solution de Hasselbach-Schneider (HS) : KCl 0,5 M, $MgCl_2$ 1 mM, $Na_4P_2O_7$ 10 mM, KH_2PO_4 10 mM.

Toutes les extractions ont été effectuées à une température strictement inférieure à + 4°C.

L'extraction est réalisée sur 15 g de muscle homogénéisés dans 7 volumes de solution d'extraction. Les temps d'extraction sont fixés à 10 minutes ou 2 heures. A l'issue de ce temps, 7 volumes de solution d'extraction sont ajoutés et les homogénats sont centrifugés à 20 000 *g* pendant 45 minutes (MSE Speed 18).

Après centrifugation les protéines myofibrillaires sont purifiées par précipitation obtenue après dilution des milieux d'extraction jusqu'à une force ionique de 0,05 puis remises en solution dans un milieu KCl 0,6 M, *Tris* HCl 0,02 M, pH 7,2, $MgCl_2$ 1 mM. Le cycle « précipitation-remise en solution » est répété deux fois.

2. — *Dissociation de l'actomyosine*

Le taux de myosine dans l'actomyosine est déterminé par une technique adaptée à partir de la méthode WEBER (1956). L'actomyosine en solution dans KCl 0,6 M, $MgCl_2$ 1 mM, *Tris* HCl 0,02 M, pH 7,2 est dissociée par addition au milieu de pyrophosphate tétrasodique 10 mM à une température de 0°C puis centrifugée à 105 000 *g* pendant deux heures (centrifugeuse Beckman Rotor 50 T I). Les protéines du surnageant représentent la myosine totale.

3. — *Étude de la superprécipitation*

La superprécipitation de l'actomyosine est suivie par l'enregistrement de l'évolution de la densité optique à 660 nm (Spectrophotomètre Safas Spectralux, enregistreur Sefram).

La superprécipitation est réalisée en milieu *Tris* HCl 0,02 M, pH 7, 2, $MgCl_2$ 1 mM, KCl 0,05 M ou KCl 0,1 M, ATP $5 \cdot 10^{-4}$ M et à la température de + 20°C.

Nous avons défini une vitesse initiale de superprécipitation qui est la variation relative de densité optique à 660 nm pendant 30 secondes après injection d'ATP dans la cuve du spectrophotomètre.

4. — *Dosage des protéines*

Les concentrations en protéines sont mesurées en dosant l'azote par la méthode de Kjeldahl et en adoptant le coefficient de transformation de 6,25.

5. — *Mesure des caractéristiques mécaniques du muscle*

Les mesures ont été effectuées à l'aide de l'appareil de SALE (1971) ; le travail est exprimé en cm·kg/cm² et la force de cisaillement en kg/cm².

RÉSULTATS

1. — *Mesures physiques de l'évolution de la tendreté*

L'étude de l'évolution *post mortem* de la tendreté de la viande peut être abordée par le biais de la détermination des variations de quelques carastéristiques mécaniques du muscle au cours de cette période (SALE et VALIN, 1970). A cette fin nous avons mesuré l'évolution de la force de cisaillement, du travail correspondant à ce cisaillement ainsi que le rapport du travail à la force de cisaillement, ce dernier paramètre permettant de caractériser les modifications de la résistance à la compression du muscle.

Le tableau 1 rapporte l'évolution de ces différents paramètres entre 1 et 8 jours *post mortem*, et le tableau 2 traduit la variation relative entre 1 jour et 8 jours de ces paramètres.

D'une façon générale, la maturation se caractérise par une diminution de la force de cisaillement et du travail correspondant. On peut noter que l'abaissement relatif de la force de cisaillement est variable selon les animaux et toujours inférieure à la diminution relative du travail de cisaillement.

TABLEAU 1

Mesures à 1 jour et 8 jours post mortem *du travail de cisaillement W, de la force de cisaillement σ et du rapport du travail à la force de cisaillement*

Bœuf n°	Travail W		Cisaillement σ		W/σ	
	1 j	8 j	1 j	8 j	1 j	8 j
1	1,25 ± 0,3	1,04 ± 0,07	2,7 ± 0,5	2,53 ± 0,38	0,47	0,41
2	1,4 ± 0,24	0,55 ± 0,11	2,3 ± 0,34	1,7 ± 0,6	0,61	0,33
3	1,86 ± 0,3	0,90 ± 0,19	3,56 ± 0,4	2,35 ± 0,4	0,52	0,38
4	1,95 ± 0,16	0,85 ± 0,14	3,16 ± 0,29	1,76 ± 0,17	0,61	0,48
5	2,33 ± 0,2	1,18 ± 0,2	3,54 ± 0,4	2,4 ± 0,34	0,65	0,49
6	1,05 ± 0,28	0,5 ± 0,10	2,35 ± 0,29	1,45 ± 0,28	0,45	0,34
7	1,57 ± 0,20	0,76 ± 0,06	3,03 ± 0,50	2,30 ± 0,33	0,52	0,33
8	1,77 ± 0,29	0,69 ± 0,08	2,68 ± 0,25	1,63 ± 0,23	0,65	0,42

TABLEAU 2

Variation relative entre 1 et 8 jours de W, σ et W/σ

Bœuf n°	$\frac{W_1 - W_8}{W_1}$	$\frac{\sigma_1 - \sigma_8}{\sigma_1}$	$\frac{W_1/\sigma_1 - W_8/\sigma_8}{W_1/\sigma_1}$
1	— 0,17	— 0,06	— 0,12
2	— 0,60	— 0,26	— 0,46
3	— 0,52	— 0,34	— 0,27
4	— 0,56	— 0,44	— 0,21
5	— 0,49	— 0,32	— 0,266
6	— 0,52	— 0,38	— 0,245
7	— 0,51	— 0,24	— 0,36
8	— 0,61	— 0,39	— 0,35

2. — *Évolution subie par les protéines myofibrillaires*

2. 1. *Solubilité des protéines myofibrillaires.*

Sur les animaux 5, 6, 7 et 8 nous avons procédé à l'extraction des protéines myofibrillaires à l'aide de 3 milieux d'extraction, la solution de Weber-Edsall, une solution de phosphate bipotassique 0,266 M et la solution de Hasselbach et Schneider.

Le tableau 3 rapporte l'évolution des solubilités exprimées en mg par 15 g de tissu frais.

TABLEAU 3

Protéines myofibrillaires solubilisées en deux heures d'extraction à 1 et 8 jours post mortem

Bœuf n°	Weber-Edsall		Phosphate		Hasselbach-Schneider	
	1 jour	8 jours	1 jour	8 jours	1 jour	8 jours
5	335	334	394	442	633	727
6	520	818	552	617	601	683
7	647	646	481	674	772	804
8	502	760	417	740	817	850

Il faut noter que les augmentations de solubilité qui caractérisent la période de maturation sont moins nettes dans les présentes conditions expérimentales que celles enregistrées pour des durées d'extractions classiques de 24 heures. Les résultats de ce tableau indiquent également, sur le plan des quantités extraites, une certaine analogie entre les milieux phosphate et Weber-Edsall, milieux de même pH et même force ionique, seule la nature des ions présents en solution étant différente, alors que la solution de Hasselbach et Schneider entraîne des rendements d'extraction supérieurs. Dans 15 g de muscle il y a environ 1 500 mg de protéines myofibrillaires. On peut constater qu'en deux heures d'extraction à 8 jours *post mortem* le milieu HS solu-

bilise pratiquement 50 p. 100 des protéines myofibrillaires totales. Or ce milieu tamponné à pH 6,5 contient des pyrophosphates dont l'effet dissociant sur l'actomyosine permet une solubilisation plus importante de la myosine qui représente 50 p. 100 des protéines myofibrillaires totales. Les solubilités plus élevées enregistrées avec ce milieu sont dues à une meilleure solubilisation de la myosine, ce qui est confirmé par l'analyse de la composition des fractions myofibrillaires extraites.

2. 2. *Nature des fractions protéiques extraites.*

Nous considérons successivement la fraction myosine, ou plus exactement la fraction des protéines myofibrillaires qui a des propriétés de solubilité du type de celles de la myosine, puis la fraction actine, qui comprend l'actine et les protéines myofibrillaires associées, troponines, tropomyosines et actinines.

2. 21. *Évolution de la solubilité de la fraction myosine.*

Sur les solutions obtenues après deux heures d'extraction dans les trois milieux considérés, nous avons déterminé la quantité de protéines qui n'est pas précipitée à une force ionique de 0,15 à pH neutre (myosine libre) et la quantité de myosine totale. Le tableau 4 rapporte ces résultats exprimés en mg de protéines pour 15 g de tissu frais.

TABLEAU 4

Myosine libre et totale extraite à 1 jour et 8 jours post mortem

ML : myosine libre MT : myosine totale

Bœuf n°		5		6		7		8	
		ML	MT	ML	MT	ML	MT	ML	MT
WE	1 jour	72	190	49	435	64	350	43	300
	8 jours	78	195	50	490	75	435	62	394
Ph	1 jour	89	260	49	447	86	244	42	285
	8 jours	100	263	54	363	128	495	106	377
HS	1 jour	297	536	253	500	225	658	98	705
	8 jours	285	525	360	580	376	725	178	730

Ces résultats confirment le fait que le milieu HS permet d'extraire plus de myosine que les deux autres milieux d'extraction. On constate d'autre part une tendance à l'augmentation des quantités de myosine libre et totale solubilisées après maturation. Cependant si on compare ces résultats avec ceux du tableau 3 on peut vérifier que, mis à part l'animal n° 7, le pourcentage de myosine totale dans l'actomyosine diminue entre 1 et 8 jours *post mortem.*

2. 22. *Évolution de la solubilité de la fraction actine.*

2. 221. *Protéines myofibrillaires solubilisées en 10 minutes d'extraction.*

Afin de vérifier l'hypothèse de Soloviev (1966) selon laquelle la dissociation de la liaison actine-myosine s'opère au cours de la maturation, nous avons procédé,

comme cet auteur, à des extractions de très courtes durées (10 mn) avec le milieu Weber-Edsall. Nous avons également procédé dans les mêmes conditions avec la solution phosphate bi-potassique.

Le tableau 5 rapporte les solubilités obtenues avec ces deux milieux d'extraction.

TABLEAU 5

Protéines myofibrillaires extraites après 10 minutes d'extraction à 1 jour et 8 jours post mortem

Résultats exprimés en mg par 15 g de tissu frais

Bœuf n°	Weber-Edsall		PO_4HK_2	
	1 jour	8 jours	1 jour	8 jours
1	205	83	220	66
2	111	313	80	60
3	228	250	53	41
4	212	360	57	27

Pour déceler la présence ou l'absence d'actine dans le mélange obtenu, nous avons employé le test de superprécipitation en milieu KCl 0,05 M, test qui est beaucoup plus sensible que la mesure de l'évolution de la viscosité en milieu KCl 0,6 M après addition d'ATP à la solution de protéines myofibrillaires.

Le tableau 6 rapporte les vitesses de superprécipitation enregistrées.

TABLEAU 6

Évolution des vitesses de superprécipitation des protéines myofibrillaires obtenues après 10 minutes d'extraction à 1 jour et 8 jours post mortem

Bœuf n°	Weber-Edsall		PO_4HK_2	
	1 jour	8 jours	1 jour	8 jours
1	266	273	0	0
2	450	2 300	0	**
3	0	950	0	300
4	330	283	0	130

** : La superprécipitation s'est développée plusieurs minutes après addition de l'ATP.

Seul le milieu phosphate permet à un jour *post mortem* d'extraire de la myosine sans actine, mais 8 jours *post mortem* le test est positif. Il convient de noter que pour des temps d'extraction de 30 minutes en milieu phosphate, le test est positif même 1 jour *post mortem*. Il faut remarquer également que pour l'animal n° 1, pour lequel

la maturation, selon les critères physiques, a été pratiquement nulle, le comportement des protéines dans le test de superprécipitation est identique à 1 jour et 8 jours.

2. 222. *Protéines myofibrillaires solubilisées en deux heures d'extraction.*

L'intensité de superprécipitation de l'actomyosine en fonction de la force ionique et du taux d'ions Ca^{++} dans le milieu dépend de la présence dans l'actomyosine testée d'autres protéines myofibrillaires dites de régulation. Pour vérifier la présence ou l'absence de ces protéines dans les actomyosines extraites 1 jour et 8 jours *post mortem*, nous avons étudié les cinétiques de superprécipitation à pH neutre en milieu KCl 0,1 M et KCl 0,05 M avec ou sans EGTA, tous autres paramètres étant égaux par ailleurs.

Le tableau 7 traduit l'évolution du rapport de la vitesse de superprécipitation en milieu KCl 0,1 M à la vitesse en milieu KCl 0,05 M.

TABLEAU 7

Évolution du rapport de la vitesse de superprécipitation en milieu KCl 0,1 M à la vitesse en milieu KCl 0,05 M entre 1 et 8 jours post mortem

Bœuf n°	Milieu d'extraction	1 jour	8 jours
5	WE	1,15	0,90
	Ph	0,95	0,66
	HS	1	0,47
6	WE	1,23	0,6
	Ph	2,3	0,7
	HS	2,65	0,5
7	WE	1,02	0,31
	Ph	1,37	0,12
	HS	0,58	0,63
8	WE	0,55	0,12
	Ph	0,50	0,12
	HS	0,13	0,09

On enregistre une diminution de ce rapport qui traduit dans tous les cas une augmentation importante de la vitesse en milieu KCl 0,05 M, alors que la vitesse en milieu KCl 0,1 M est constante ou diminue. Les chiffres de ce tableau sont comparables à ceux du tableau 6. Cette augmentation systématique de la vitesse de superprécipitation en milieu de faible force ionique ne peut s'interpréter que par l'accroissement à 8 jours *post mortem* de la fraction actinine dans l'extrait myofibrillaire obtenu.

Parallèlement, en présence d'EGTA et en milieu KCl 0,1 M la vitesse de superprécipitation à 8 jours *post mortem* est pratiquement nulle, alors qu'à 1 jour *post mortem* dans les mêmes conditions l'intensité de superprécipitation est simplement diminuée (fig. 1). Ce résultat traduit une augmentation de la sensibilité de l'actomyosine aux ions Ca^{++} au cours de la maturation.

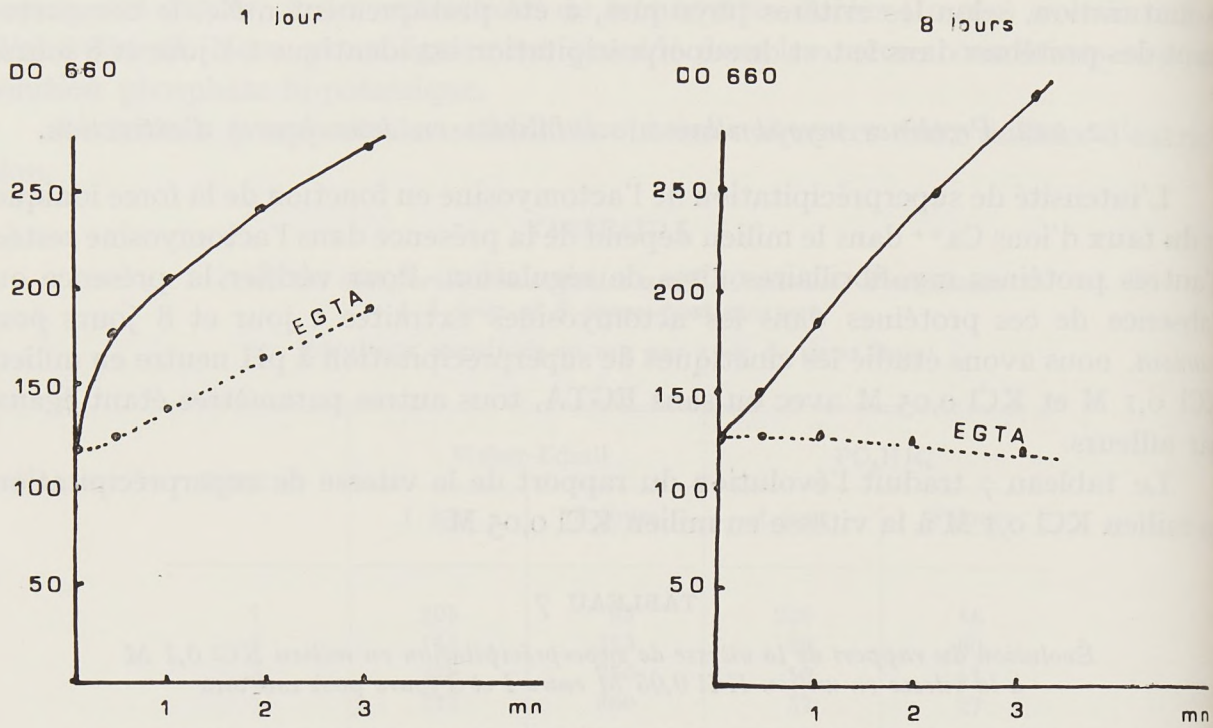


FIG. 1. — *Superprécipitation en milieu KCl 0,1 M ;* Tris *HCl 0,02 M pH 7,2 $MgCl_2$ 1 mM ; EGTA 25 µM ; ATP 5 · 10^{-4}M ; concentration en protéine 0,9 mg/ml 1 jour* post mortem *et 0,9 mg/ml 8 jours* post mortem

DISCUSSION ET CONCLUSION

Il est bien établi que la solubilisation de la myosine peut s'effectuer en 30 à 60 minutes en milieu KCl 0,4-0,6 M et à pH neutre. Dans ces conditions et pour des muscles prélevés immédiatement après l'abattage, l'actine ne se solubilise pratiquement pas. MIHALYI et ROWE (1966) et HAGA *et al.* (1966) ont montré que la solubilisation de l'actine était fonction de la destruction de la liaison des filaments d'actine à la strie Z. D'autre part l'actine a une très forte affinité pour la myosine, et en absence d'agents qui dissocient la liaison actine-myosine (ATP ou pyrophosphate), dans un muscle dont l'intégrité structurale est respectée, la solubilité de la myosine est très faible ; par contre, en présence de ces agents il est possible d'extraire pratiquement toute la myosine avec une pollution minimale d'actine.

Compte tenu de tous ces faits, nous avons choisi d'utiliser des temps d'extraction très courts et de comparer les résultats obtenus avec le milieu de Weber-Edsall avec les solubilités réalisées à l'aide de milieux qui préviennent la solubilisation de l'actine, c'est-à-dire le milieu de Hasselbach-Schneider qui contient des pyrophosphates et le milieu phosphate bi-potassique qui ne dissocie pas la liaison actine-myosine mais qui a la propriété de stabiliser la liaison strie Z et filaments d'actine (MIHALYI et ROWE, 1966). Nous avons utilisé le milieu de Hasselbach-Schneider et non un milieu de concentration supérieure en pyrophosphate (PENNY, 1968), car pour des concentrations de pyrophosphate de 0,1 M toute la myosine est solubilisée, quel que soit le stade d'évolution *post mortem*.

Des résultats rapportés il ressort que les milieux WE et Ph à un jour et huit jours *post mortem* conduisent à l'obtention de fractions myofibrillaires très compa-

rables tant du point de vue quantitatif que qualitatif, si l'on en juge par le test de superprécipitation. D'autre part le milieu HS dès un jour *post mortem* provoque la solubilisation de quantité non négligeable d'actine (environ 100 mg pour 15 g tissu frais). Donc on peut conclure que si la maturation se caractérise bien par le détachement progressif des filaments d'actine de la strie Z, il convient aussi de noter que dès la *rigor mortis* installée (un jour *post mortem*) la strie Z a déjà perdu partiellement ses propriétés de stabiliser les filaments d'actine alors qu'à ce stade de l'évolution *post mortem* les études antérieures en microscopie électronique n'ont pas mis cette altération en évidence.

Compte tenu de l'augmentation de solubilité de l'actine, les protéines myofibrillaires qui lui sont associées doivent présenter une évolution de leur solubilité. Nous avons essayé de la mettre en évidence par l'étude de la superprécipitation de l'actomyosine, le rôle de ces protéines dans l'interaction actine-myosine étant maintenant sinon totalement connu, du moins globalement bien défini. L'interprétation de la superprécipitation est délicate et difficile à quantifier. Aussi nous avons déterminé des conditions telles que la superprécipitation se déclenche dès l'injection de l'ATP dans la cuve du spectrophotomètre, de façon à éliminer toute phase de latence. Pour cela nous avons travaillé avec des concentrations initiales d'ATP 2 à 4 fois plus faibles que celles habituellement utilisées (Herring *et al.*, 1969 ; Goll *et al.*, 1970) et nous avons mesuré la vitesse initiale de cette transformation. Il est, par ailleurs, bien démontré (Penny, 1968) que dans la période *post mortem* étudiée l'activité ATPasique de la myosine ne subit pas de dénaturation ; ainsi le test de superprécipitation qui traduit l'interaction actine-myosine est fonction de la présence dans le milieu des protéines dites de régulation. Il est bien établi que le complexe troponine-tropomyosine inhibe l'interaction actine-myosine en absence de Ca^{++} et en présence d'ATP et Mg^{++}, et d'autre part que l'un des constituants de l'α-actinine augmente considérablement l'intensité de la superprécipitation en milieu de faible force ionique, alors que pour des concentrations de KCl 0,1 M l'effet activateur s'annule. Des résultats rapportés, il ressort que l'actomyosine extraite huit jours *post mortem* manifeste une intensité de superprécipitation en milieu KCl 0,05 M très supérieure à celle extraite à un jour. Ce résultat est très général et se manifeste même lorsque l'extractibilité de l'actine n'est pas augmentée à huit jours. On peut penser que cela traduit une solubilité supérieure à huit jours des constituants de la strie Z ou du moins de la fraction active de l'α-actinine. Ce résultat est à rapprocher de ceux de Fukazawa *et al.* (1970) qui ont montré que sur le muscle de poulet il n'extrayait en *pre rigor* que le constituant inactif et que la fraction active n'apparaissait en solution qu'après 48 heures de maturation.

En milieu KCl 0,1 M nous avons constaté, par contre, une diminution de la vitesse initiale de superprécipitation après 8 jours de maturation. Ceci correspond aux observations de Herring *et al.* (1969). De plus en présence d'EGTA à 8 jours *post mortem* on annule la superprécipitation, alors qu'à un jour *post mortem* elle n'est que partiellement inhibée. Ceci n'est observable que si l'extraction, homogénéisation du muscle comprise, est effectuée à une température strictement inférieure à + 4°C, sinon pour des températures supérieures l'inhibition par l'EGTA est totale dès un jour *post mortem*.

De l'ensemble de ces résultats on peut déduire que, d'une part la maturation se traduit par une augmentation de la solubilité de tous les constituants myofibrillaires,

y compris des protéines dites de régulation (ce résultat corroborerait ceux de PENNY (1970)) et d'autre part que ces protéines n'ont pas perdu leurs propriétés, donc n'ont pas subi d'atteinte, sinon dans leur mode de liaisons à l'intérieur de la structure myofibrillaire. Cette dernière conclusion n'est pas totalement partagée en particulier par FUKAZAWA *et al.* (1970) et GOLL *et al.* (1970) qui considèrent qu'une certaine dénaturation des protéines dites de régulation intervient. Avec ces protéines extraites huit jours *post mortem*, ces auteurs ne retrouvent pas une efficacité dans la régulation de la superprécipitation égale à celle manifestée par ces fractions extraites sur le muscle en *rigor*.

Toutes ces transformations interviennent dans une période au cours de laquelle la viande s'attendrit et les caractéristiques mécaniques du muscle évoluent. Dans un rapport précédent (SALE et VALIN, 1970) nous avions émis l'hypothèse que la mesure du travail, et surtout celle du rapport W/σ, traduisaient l'évolution imputable aux transformations myofibrillaires. L'évolution du rapport traduit mieux le rôle de ces transformations que le travail seul, car la mesure du travail est la somme de plusieurs travaux de compression, d'extrusion et de cisaillement. Les solubilités, en particulier à huit jours *post mortem*, et les évolutions les plus importantes de solubilité tant quantitatives que qualitatives, correspondent aux animaux pour lesquels W/σ décroît le plus et ne semblent pas en relation directe avec la variation de l'effort de cisaillement qui, vraisemblablement, est relié à l'état (quantité et répartition) du tissu conjonctif. Il est en outre intéressant de noter que pour l'animal n° 1 il n'y a évolution ni des caractéristiques mécaniques ni des propriétés myofibrillaires.

En conclusion, on peut constater que globalement l'évolution myofibrillaire se traduit par une désorganisation progressive de l'appareil contractile qui est provoquée par un affaiblissement des liaisons des protéines à l'intérieur de la structure myofibrillaire, sans que l'on puisse affirmer que des dénaturations ou des pertes de protéines prises individuellement se produisent ; ce dernier point nécessite des investigations ultérieures. D'autre part, l'ensemble de ces résultats ne permet en rien de préjuger des mécanismes mis en jeu et en particulier n'implique ni ne rejette une intervention des protéases intracellulaires.

Sur le plan de la tendreté, il semble que l'évolution myofibrillaire se traduit surtout par une diminution de la résistance à la compression du muscle et du travail de compression et d'écoulement plus que par un abaissement de la force de cisaillement, qui est très étroitement liée à l'état du tissu conjonctif. Ceci permet peut-être de comprendre le caractère limité du gain de tendreté *post mortem* des muscles riches en tissu conjonctif.

Reçu pour publication en juin 1971.

SUMMARY

MATURATION OF MEAT. *POST MORTEM* DEVELOPMENT OF TENDERNESS AND BIOCHEMICAL CHANGES IN MYOFIBRILLAR PROTEINS

The tenderness of meat depends on the properties of two constituent parts of the muscle, namely, the connective tissue and the contractile system.

During the maturation process the meat gets more and more tender. The analysis of the muscle's mechanical properties shows that, during that period, the shearing force and shearing stress decrease as well as the compressive strenght.

Likewise, the investigation of myofibrillar proteins derived from short-term (10 minutes and 2 hours) extractions from the three following extractive media : Weber-Edsall, dipotassium phosphate 0.226 M and Hasselbach and Schneider solution, respectively, shows :

1. an increased solubility of actimyosin during maturation ;

2. an increased amount of myosin extracted from the Hasselbach and Schneider medium which could be construed as a lower bond strenght between actin and myosine ;

3. the extraction, one day *post mortem*, of a substantial amount of actin, this meaning that as soon as *rigor mortis* has set in, the Z stria partly lost its property of stabilizing actin fibres.

The greater the myofibrillar changes are, the lesser the muscle's compressive strenght.

ZUSAMMENFASSUNG

DAS REIFEN DES FLEISCHES. *POST MORTEM* EVOLUTION DER ZARTHEIT UND BIOCHEMISCHE UMWANDLUNG DER FEINFASERIGEN PROTEINE

Die Zartheit des Fleisches ist von den Eigenschaften von zwei Muskelbestandteilen, dem Bindegewebe und dem zusammenziehbaren System, abhängig.

Im Laufe der Reifung wächst die Zartheit des Fleisches. Die Analyse der mechanischen Eigenschaften des Muskels im Laufe dieser Periode zeight, dass die Scherkraft und die Scherarbeit sowie der Widerstand gegen die Muskelzusammendrückung abnehmen.

Die gleichzeitige Untersuchung der an Hand von kurzfristigen Extrahierungen (10 Miuuten und 2 Stunden) erhaltenen feinfaserigen Proteinen aus verschiedenen Extraktions substraten : Weber-Edsall, Lösung von Kaliumbiphosphat 0,266 M und Hasselbach und Schneider-Lösung, zeight :

— eine Steigerung der Löslichkeit des Aktomyosins im Laufe des Reifens ;

— einem Zuwachs der aus dem Hasselbach und Schneider substrat extrahierten Myosinmenge, was eine Verminderung der Bindungsstärke zwischen dem Aktin und dem Myosin erklären könnte ;

— Die Extraktion an einem Tage *post mortem* ergibt eine bedeutende Menge von Aktin, was bedeutet dass, sofort beim Eintritt der *rigor mortis*, die Faser Z ihre Eigenschaft, die Aktinfäden zu stabilisieren, teilweise verliert.

Je bedeutender die feinfaserigen Umwandlungen sind, desto kleiner ist der Widerstand gegen die Muskelzusammendrückung.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Davey C. L., Dickson M. R., 1970. Studies in meat tenderness. 8. Ultrastructural changes in meat during aging. *J. Food Sci.*, **1**, 56-60.

Fujimaki M., Arakawa N., Okitani A., Tagagi O., 1965. The changes of myosin B during storage of rabbit muscle. *J. Food Sci.*, **6**, 937-943.

Fukazawa T., Yasui T., 1967. The change in zigzag configuration of the Z line of myofibrils. *Biochim. biophys. Acta*, **140**, 534-536.

Fukazawa T., Nakai H., Ohdi S., Yasui T., 1970. Some properties of myofibrillar proteins obtained from low ionic strenght extracts of washed myofibrils from *pre* and *post rigor* chicken pectoral muscle. *J. Food. Sci.*, **4**, 464-468.

Goll D. E., Arakawa N., Stromer M. H., Busch W. A., Robson R. M., 1970. Chemistry of muscle proteins as a food. In : *The physiology and biochemistry of muscle as a food.* Tome 2. Briskey, Cassens et Marsh. The University of Wisconsin Press.

Gunther H., Turba F. K., 1969. Changes of some protein fractions cf beef muscle *post mortem*. *J. Food. Sci.*, **5**, 469-470.

Haga T., Maruyama K., Noda H., 1966. Formation of actomyosin during the extraction of muscle with Weber-Edsall solution. *Biochim. biophys. Acta*, **94**, 226-237.

HERRING H. K., CASSENS R. G., BRISKEY E. J., 1969. Studies on bovine natural actomyosin. Relationship of ATPase and contractility to tenderness of muscle. *J. Food Sci.*, **5**, 389-391.

MIHALYI E., ROWE A. J., 1966. Studies on the extraction of actomyosin from rabbit muscle. *Biochim. Z.*, **345**, 267-295.

PENNY I. F., 1968. Effect of ageing on the properties of myofibrils of rabbit muscle. *J. Sci. Food Agric.*, **19**, 518-524.

PENNY I. F., 1970. Conditioning of bovine muscle. II. Changes in the composition of extracts of myofibrils after conditioning. *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 303-306.

SALE P., VALIN C., 1970. Problèmes posés par la détermination des modifications de la structure du muscle au cours de la maturation. *16th European meeting of meat research workers*. Warna.

SOLOVIEV V. I., 1966. The biochemical process of meat ageing. *12th European meeting of meat research workers*. Belgrade.

VALIN C., 1967. Évolution *post mortem* des protéines myofibrillaires du muscle de bovin. *13th European meeting of meat research workers*. Rotterdam.

VALIN C., 1968. *Post mortem* changes in myofibrillar protein solubility. *Food Technol.*, **3**, 171-173.

WEBER A., 1956. The ultracentrifugal separation of L-myosin and actin in an actomyosin sol under the influence of ATP. *Biochim. biophys. Acta*, **19**, 345.

SALÉ P., 1971. Le cisaillement des viandes crues : analyse et interprétation pour divers muscles en état de *rigor mortis* et après maturation. *17 th European meeting of meat research workers*. Bristol.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 179-183.

NOTE TECHNIQUE

LA DÉTERMINATION DES CONSTITUANTS NUCLÉIQUES DU BLÉ ET LEUR RÉPARTITION DANS LE GRAIN

J.-C. AUTRAN et A. BOURDET
avec la collaboration technique de Chantal GARNIER et Ginette GOBIN

Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I. N. R. A., 16, rue Nicolas-Fortin, 75 - Paris (13e)

RÉSUMÉ

Plusieurs méthodes de détermination des acides nucléiques ont été appliquées au grain de blé mûr et à quelques produits de sa mouture industrielle. L'origine des différences observées dans les résultats est discutée. Trois méthodes semblent cependant s'accorder à fournir des valeurs significatives permettant de donner une image de la répartition histologique des constituants nucléiques dans le grain de blé.

Mots clés : *acides nucléiques, grain de blé, dosage.*

La détermination quantitative des acides nucléiques dans un matériel biologique constitue toujours une étape nécessaire au cours de l'étude de ces composés.

D'innombrables travaux relatifs aux tissus animaux ont abordé cette question et des revues très complètes ont été publiées (HUTCHISON et MUNRO, 1961 ; MUNRO et FLECK, 1966). S'il apparaît que le domaine animal ne présente que peu de difficultés à cette étude, les auteurs signalent, par contre, l'échec des méthodes classiques d'extraction et de dosage des acides nucléiques lorsqu'on les transpose au secteur végétal (SMILLIE et KROTKOV, 1960 ; HOLDGATE et GOODWIN, 1965 ; PRAKASH, 1970).

La détermination des acides nucléiques de tissus végétaux apparaît donc toujours plus difficile que dans les tissus animaux à cause, par exemple, de constituants parasites absorbant dans l'UV ou de polysaccharides à forte concentration qui interfèrent respectivement avec les mesures spectrophotométriques ou les dosages de sucres nucléiques.

Les difficultés sont encore plus grandes avec les tissus de réserve comme les graines de céréales, où les teneurs en ARN et en ADN sont beaucoup plus faibles que dans les tissus à métabolisme actif. Pour tenter de résoudre ce problème, nous avons volontairement choisi un matériel dont

l'étude est délicate : le grain de blé mûr. Nous lui avons appliqué les méthodes les plus classiques de détermination des acides nucléiques afin de comparer leur efficacité et de retenir les plus favorables.

Leur application à quelques produits de la mouture industrielle du blé (farine, germes, sons et remoulages) nous a permis d'établir un bilan approché de la répartition histologique des composés nucléiques dans le grain.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le Blé étudié est un *Triticum aestivum* (variété *Cappelle*). Les produits de sa mouture industrielle, classés selon leurs dimensions, sont constitués respectivement de :

— la farine (78,3 p. 100 du grain), représentative de l'albumen ;
— les gros sons (14,3 p. 100), qui correspondent aux enveloppes du grain, auxquelles la majeure partie de l'assise protéique reste attachée ;
— les remoulages bis (5,8 p. 100), contenant à la fois des débris d'enveloppes et des fragments d'assise protéique ;
— les remoulages blancs (1,6 p. 100), riches en cellulose provenant des parois cellulaires ;
— le germe, non séparé selon le diagramme de mouture utilisé, est contenu dans les remoulages. Les échantillons de germe dont il est fait état ont été spécialement préparés, dans d'autres conditions, à partir de la même variété.

Avant extraction des acides nucléiques, les différents produits ont subi un broyage (sauf la farine et les remoulages), une délipidation par l'éthanol-éther à 75°C et une élimination des composés acido-solubles à froid par l'acide perchlorique 0,25 N.

L'extraction des acides nucléiques, soit sous la forme de leurs produits d'hydrolyse, soit sous la forme de nucléoprotéines, a été réalisée à l'aide d'adaptations des techniques suivantes :

1° méthode de Schneider (1945), selon Schneider *et al.* (1950) : extraction globale à l'aide d'acide perchlorique 0,5 N à 90°C ;

2° méthode de Schmidt et Thannhauser (1945), selon l'adaptation de Smillie et Krotkov (1960) : extraction globale par incubation dans KOH 0,3 N suivie d'une séparation de l'ARN et de l'ADN par acidification du milieu ;

3° méthode de Ogur et Rosen (1950) : extraction différentielle de l'ARN et de l'ADN, respectivement par l'acide perchlorique N à 0°C et 0,5 N à 90°C ;

4° hydrolyse sulfurique (directement effectuée sur les produits) des acides nucléiques, suivie d'une précipitation sélective par le nitrate d'argent des bases puriques ainsi libérées (Netupskaya *et al.*, 1959) ;

5° extraction des acides nucléiques par NaCl 10 p. 100 à l'ébullition suivie d'une précipitation par l'alcool (Davidson et Smellie, 1952) ;

6° extraction des acides nucléiques par le phénol, selon la technique employée par Esnault (1968) ;

7° solubilisation des nucléoprotéines par NaCl 1 M, à basse température suivie d'une hydrolyse perchlorique de l'extrait dialysé et lyophilisé. Les taux d'acides nucléiques sont rapportés au produit initial sur la base de l'azote (Autran) ;

8° extraction des nucléoprotéines par NaCl 1 M, à basse température, suivie d'une précipitation à l'acide trichloracétique et d'une hydrolyse perchlorique des acides nucléiques du précipité (adaptation de la technique de Kern, 1960).

Le dosage proprement dit des acides nucléiques est réalisé à partir des extraits obtenus, soit par lectures directes en UV (lorsque le spectre est suffisamment représentatif d'un acide nucléique), soit par dosage du phosphore nucléique. L'ADN a toujours pu être déterminé spécifiquement par dosage du désoxyribose (Burton, 1956) mais, du fait de l'interférence des pentosanes du blé, l'ARN n'a jamais pu être évalué par l'intermédiaire de son ribose.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Certains des procédés d'extraction utilisés ne semblent pas convenir à la détermination quantitative des acides nucléiques dans les matériels étudiés.

Ainsi, les extractions par NaCl 10 p. 100 à l'ébullition et par le phénol n'apparaissent pas

quantitatives, surtout pour l'ADN. Par contre, les acides nucléiques sont solubilisés de façon quasi totale et vraisemblablement sous forme de nucléoprotéines, lorsqu'on procède à une dispersion énergique dans NaCl 1 M, à basse température. Le dosage à partir d'un hydrolysat perchlorique à chaud de l'extrait salin dialysé ne présente alors aucune difficulté. En revanche, la précipitation trichloracétique de ces mêmes nucléoprotéines, comme le préconise KERN (1960), n'apparaît pas quantitative, particulièrement chez l'albumen du grain de blé.

Le meilleur procédé d'extraction globale semble être celui de SCHNEIDER (1945), à condition d'opérer avec l'acide perchlorique à 90°C (SCHNEIDER *et al.*, 1950).

L'extraction différentielle selon OGUR et ROSEN (1950) donne de bons résultats, mais une faible partie de l'ARN semble échapper à l'extraction à froid. Enfin, la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945), qui permet une bonne séparation des deux types d'acides nucléiques, est d'un emploi délicat avec les produits riches en amidon.

Les principales difficultés proviennent du dosage lui-même : en effet, même quand l'extraction est quantitative, le spectre d'absorption des extraits à chaud n'est généralement pas assez caractéristique pour permettre une lecture directe en UV, à 260 ou 265 nm. On note fréquemment des perturbations vers 320 nm et 280 nm, particulièrement chez les enveloppes du grain de blé, ayant peut-être pour origine des phénols ou des produits de dégradation de la lignine.

L'estimation par l'intermédiaire du phosphore nucléique se heurte aussi à des difficultés, à cause de la richesse du grain en amidon ; en effet, les résultats sont considérablement faussés par le fait que la majeure partie du phosphore contenu dans l'amidon (0,04 à 0,08 p. 100) se trouve solubilisée dans les mêmes conditions que le phosphore nucléique.

Dans ces conditions, aucun procédé ne semble permettre de déterminer la somme ARN + ADN, même lorsque l'extraction est quantitative. Le dosage reste cependant possible par mesure spectrophotométrique des bases puriques obtenues par précipitation sélective au nitrate d'argent à partir d'un hydrolysat sulfurique du matériel.

En définitive, les trois seules méthodes de détermination qui semblent utilisables avec les matériels étudiés, et qui conduisent d'ailleurs à des résultats analogues, sont les suivantes :

— extraction des nucléoprotéines par NaCl 1 M et dosage des acides nucléiques sur les produits dialysés et lyophilisés obtenus (AUTRAN) ;

— hydrolyse sulfurique du grain et estimation par les bases puriques (NETUPSKAYA *et al.*, 1959);

— extraction perchlorique différentielle (OGUR et ROSEN, 1950) avec estimation par défaut de l'ARN par lecture UV, et de l'ADN par colorimétrie (BURTON, 1956).

Il faut signaler que les écarts constatés comparativement entre les 8 méthodes varient avec le matériel : ces écarts sont faibles avec le germe de blé, dont les tissus sont pauvres en impuretés et riches en acides nucléiques, mais sont importants avec le blé entier ou la farine. Dans ce dernier matériel, il se pourrait de plus qu'une dégradation des acides nucléiques, consécutive à la dégénérescence des cellules de l'albumen au cours de la maturation, explique certaines propriétés de solubilité anormales, se traduisant par une plus mauvaise reproductibilité des résultats.

La concordance des valeurs obtenues par les 3 méthodes retenues a cependant permis d'établir le tableau 1 (en mg d'acides nucléiques pour 100 g de matériel sec).

Il est également intéressant de rapporter les quantités d'acides nucléiques au grain total en faisant intervenir les proportions relatives de chacune des « régions histologiques » (tabl. 2) (en p. 100 d'acides nucléiques par rapport aux acides nucléiques totaux du grain entier).

Les acides nucléiques semblent alors se diviser en trois parties d'importances voisines, correspondant à l'albumen, aux remoulages et aux enveloppes. Si l'on considère que les acides nucléiques contenus dans les remoulages proviennent uniquement du germe, on trouve — compte tenu de l'analyse nucléique des préparations purifiées de cette région — une teneur du grain en germe de 2,5 p. 100 environ, pourcentage communément signalé.

Cela permet de penser sur le germe lui-même n'apporte que le tiers environ des acides nucléiques du grain et d'infirmer l'hypothèse selon laquelle les acides nucléiques présents dans la farine pourraient avoir le germe pour origine. Il nous semble, au contraire, qu'une partie, au moins, des composés nucléiques de la farine préexiste dans l'albumen du grain et qu'elle corres-

TABLEAU I

Composition nucléique du blé Cappelle *et de quelques produits de sa mouture industrielle* (en mg d'acides nucléiques pour 100 g de matériel sec)

	ARN	ADN	AN totaux	ARN/ADN
Blé (100 %)	139	86	225	1,62
Farine (78,3 %)	62	50	112	1,24
Remoulages blancs (1,6 %)	542	253	795	2,14
Remoulages bis (5,8 %)	855	365	1 220	2,34
Gros sons (14,3 %)	353	167	520	2,11
Germe	2 527	1 028	3 555	2,46

TABLEAU 2

Pourcentage d'acides nucléiques des différents produits de mouture par rapport aux acides nucléiques du grain entier

	ARN		ADN		AN totaux	
Farine	30,8		44,0		35,6	
Remoulages blancs	5,5	37,0	4,5	29,2	5,2	34,2
Remoulages bis	31,5		24,7		29,0	
Gros sons	32,2		26,8		30,2	

ponde aux vestiges des systèmes ayant participé à la synthèse des tissus de réserve durant la maturation. Enfin, les acides nucléiques trouvés dans les enveloppes du grain sont probablement apportés par l'assise protéique.

Cette étude des acides nucléiques ne constitue que les préliminaires d'un travail ayant pour but l'identification des nucléoprotéines dans les différents matériels envisagés.

Il se peut, en effet, que d'éventuelles différences qualitatives dans la constitution des protéines apparemment associées aux acides nucléiques apportent des données bien plus précises dans la connaissance des différentes régions du grain. C'est ce que nous étudions actuellement.

Reçu pour publication en mars 1971.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUTRAN J.-C. (Résultats non publiés).

BURTON K., 1956. A study for the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.*, **62**, 315-323.

DAVIDSON J. N., SMELLIE R. M. S., 1952. Phosphorus compounds in the cell. *Biochem. J.*, **52**, 594-599.

ESNAULT R., 1968. Étude de l'action de l'acide β-indolyl-acétique sur le métabolisme de l'ARN de segments de coléoptiles d'avoine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **50** (11), 1887-1913.

HOLDGATE D. P., GOODWIN T. W., 1965. Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. *Phytochemistry*, **4**, 831-843.

HUTCHISON W. C., MUNRO H. N., 1961. The determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst*, **86**, 768-813.

KERN H., 1960. Zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren. *Planta*, **55**, 259-273.

MUNRO H. N., FLECK A., 1966. The determination of nucleic acids ; in : *Methods of biochemical analysis*, vol. 14 ; 113-176. Interscience Publishers, New York.

NETUPSKAYA S. V., PERUANSKII Y. V., KONAREV V. G., 1959. Détermination spectrophotométrique des acides nucléiques des végétaux, d'après les bases puriques (en russe). *Biol. Nuklein Obmena u Rastenii, Ufa, Sbornik*, 148-153.

OGUR M., ROSEN G., 1950. The nucleic acids of plant tissues. *Arch. Biochem.*, **25**, 262-276.

PRAKASH S., 1970. Recent advances in the procedures for the extraction of nucleic acids from plants and their estimation. *J. Sci. industr. Res.*, **29** (5), 244-250.

SCHMIDT G., THANNHAUSER S. J., 1945. A method for the determination of DNA, RNA, and phosphoproteins in animal tissues. *J. biol. Chem.*, **161**, 83-89.

SCHNEIDER W. C., 1945. Phosphorus compounds in animal tissues. *J. biol. Chem.*, **161**, 293-303.

SCHNEIDER W. C., HOGEBOOM G. H., ROSS H. E., 1950. *J. Nat. Cancer Inst.*, **10**, 977.

SMILLIE R. M., KROTKOV G., 1960. The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. *Canad. J. Bot.*, **38**, 31-49.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 185-192.

NOTE TECHNIQUE

TEST DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ COLLAGÉNOLYTIQUE VRAIE

J. KOPP

avec la collaboration technique de Madeleine BONNET

Station de Recherches sur la Viande,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,
63 - Saint-Genès-Champanelle

RÉSUMÉ

Une méthode simple et rapide pour la détermination de l'activité collagénolytique avec un substrat biologique est décrite. Le substrat est du collagène musculaire épimysial natif lavé des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires et mis à incuber en présence de la solution enzymatique à étudier dans du tampon pH 7,4 *Tris* HCl 0,04 M ; $CaCl_2$ 0,004 M. La température d'incubation est de 37°C. Les activités collagénolytiques et protéolytiques non spécifiques sont déterminées par la mesure de l'augmentation de la densité optique des filtrats d'incubation à 230 et 270 nm. Un mode d'expression de l'activité collagénolytique spécifique sur la base de la variation de DO_{230} est proposé. Cette méthode est bien adaptée à la détermination des activités au cours des étapes de purification de préparations enzymatiques.

Mots clés : *collagène, collagénase, activité enzymatique, méthode.*

Le seul critère pour l'identification d'une collagénase est sa grande affinité pour le collagène natif à pH neutre. L'activité des collagénases est localisée à l'intérieur des chaînes polypeptidiques hélicoïdales et non dans la région terminale des télopeptides (HEIDRICH *et al.*, 1969). Les méthodes de détermination de l'activité collagénolytique de préparations enzymatiques reposent sur l'utilisation soit de substrats synthétiques reproduisant les régions apolaires de la molécule de collagène, soit de substrats biologiques de natures très diverses.

L'étude critique de HEIDRICH *et al.* (1969) met clairement en évidence les problèmes posés par l'utilisation des substrats *synthétiques* et particulièrement pour des préparations enzymatiques partiellement purifiées. Par exemple une « collagénase » de *Pseudomonas aeruginosa* est active envers les substrats synthétiques mais inactive envers le collagène natif (WALDVOGEL et SWARTZ, 1969) ; à l'inverse on connaît actuellement des enzymes actives sur le collagène natif mais ne réagissant pas avec les substrats synthétiques (SCHAUB et STRAUCH, 1965).

Les principales études effectuées sur des collagénases à l'aide de substrats biologiques définissent l'activité par rapport à du collagène *soluble* (neutro-soluble ou acido-soluble), par des mesures de viscosité (KANG *et al.*, 1966), de pouvoir rotatoire (STARK et KÜHN, 1968) ou par

l'analyse électrophorétique des produits de dégradation (SAKAÏ et GROSS, 1967). Toutes ces techniques nécessitent une phase laborieuse d'extraction et de préparation du substrat et surtout ne permettent pas de faire intervenir dans le test le facteur réticulation du collagène substrat. Or GOLL *et al.* (1964) ont mis en évidence l'influence du degré de polymérisation du collagène sur la vitesse d'hydrolyse par la collagénase et les difficultés de l'extrapolation des résultats obtenus à partir de collagène soluble quasi monomérique au collagène fibrillaire fortement réticulé.

Lorsqu'enfin le substrat utilisé est un collagène *polymérique*, la technique généralement mise en œuvre consiste à déterminer la quantité de collagène solubilisé (sur la base de l'hydroxyproline) au cours de l'hydrolyse enzymatique (MANDL *et al.*, 1958 ; GRANT et ALBURN, 1959 ; GOLL *et al.*, 1964). Cette méthode très spécifique de détermination de l'activité collagénolytique est longue car elle nécessite une hydrolyse préalable des échantillons ; or en pratique, et en particulier au cours des étapes de purification d'une préparation enzymatique, il est important de pouvoir disposer de tests rapides permettant de localiser les fractions enzymatiques actives.

A. — PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Nous avons tenté de mettre au point une méthode simple et rapide de détermination de l'activité collagénolytique ne nécessitant pas d'hydrolyse des échantillons et qui permet donc d'effectuer éventuellement des analyses qualitatives sur ces mêmes échantillons.

Partant d'un collagène-substrat réticulé natif bien défini, la méthode proposée consiste à caractériser par des mesures spectrophotométriques les fractions du substrat solubilisées par la préparation enzymatique à étudier. Le substrat contient, en plus du collagène, une fraction de 5 à 10 p. 100 de composés non collagéniques plus ou moins étroitement associés au collagène. Il nous a paru important de conserver cette association d'éléments dans le substrat car, en pratique et en particulier dans le cas de la viande, il s'agit de dégrader cet ensemble complexe.

Des enzymes protéolytiques non spécifiques pourront dégrader à la fois les protéines non collagéniques présentes dans le substrat et les télopeptides des chaînes polypeptidiques du collagène. Il convient donc de pouvoir distinguer une action collagénolytique vraie (s'accompagnant de libération d'hydroxyproline dans la phase soluble) d'une action protéolytique non spécifique. L'étude des spectres UV des filtrats d'incubation de collagène seul, de collagène + trypsine et de collagène + collagénase, montre que le rapport :

$$\rho = \frac{DO_{230\ nm}}{DO_{270\ nm}}$$

est un bon indicateur du type d'action enregistré (fig. 1). Le spectre des filtrats résultant d'une action collagénolytique stricte (courbe *c*) présente un maximum d'absorption au voisinage de 225-230 nm, l'absorption à 270 nm étant proportionnellement très faible. Par contre, le spectre des filtrats d'incubation du collagène en présence de trypsine présente deux maxima d'absorption se situant à 215 et 270-275 nm (courbe *b*) : la composition de cette fraction du substrat et en particulier la présence de tyrosine (MANAHAN et MANDL, 1969) provenant des télopeptides sont responsables de l'augmentation de l'absorption enregistrée à 270 nm.

En étudiant simultanément les DO_{230} et $DO_{270\ nm}$ il est possible de distinguer une action protéolytique d'une action collagénolytique spécifique.

L'étude cinétique des 3 types de solubilisation (témoin, trypsine et collagénase) montre que la DO_{230} des filtrats « Témoin » et « trypsine » est pratiquement constante au-delà d'une heure d'incubation (ces fractions solubles ne contiennent pas d'hydroxyproline). En opérant par différence entre deux temps d'incubation (3 h et 1 h par ex.), seul le milieu présentant une activité collagénolytique engendrera des variations appréciables de la DO_{230}. De plus les rapports ρ calculés pour cette différence permettent de préciser la nature de l'action enregistrée.

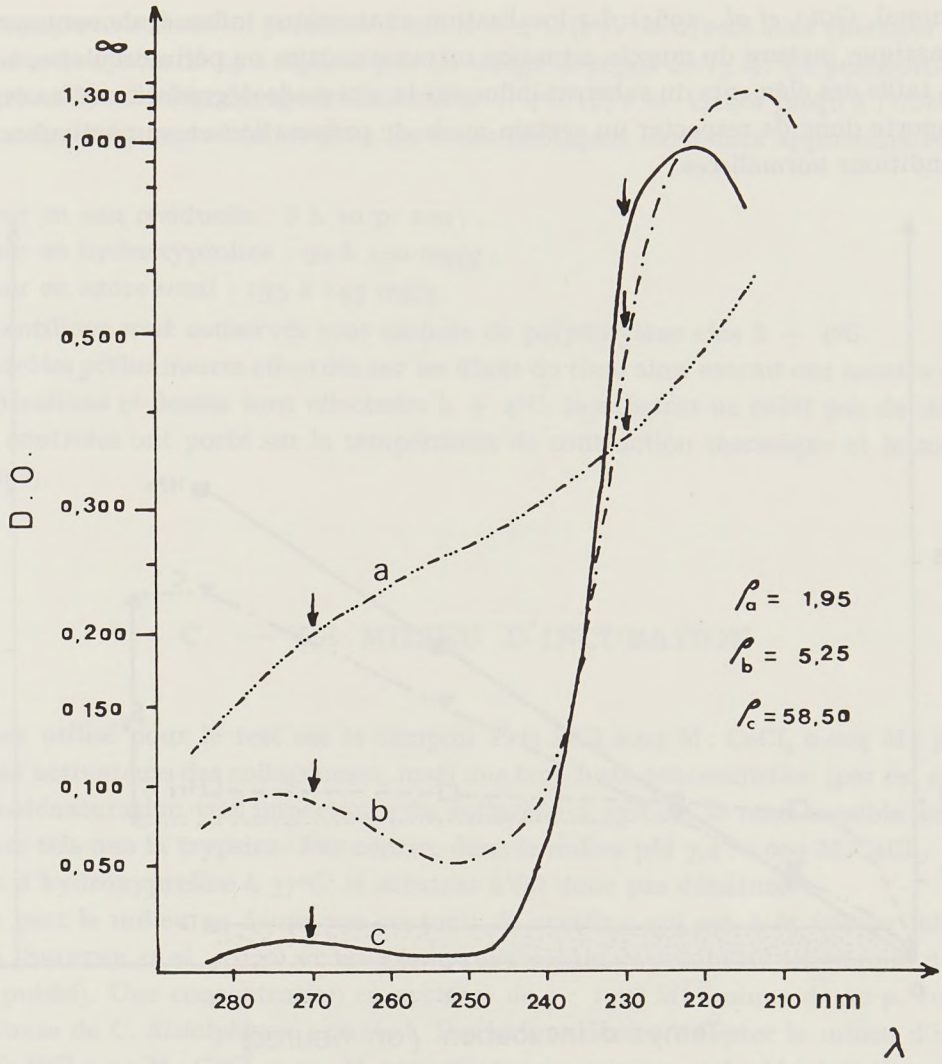


FIG. 1. — *Spectres UV de filtrats d'incubation* (37°C, 2 h)

a) Témoin collagène + tampon (non dilué)
b) Collagène + trypsine : spectre de différence contre *a*) (dilution 1/5)
c) Collagène + collagénase *C. histolyticum* « crude » : spectre de différence contre *a*) (dilution 1/5)
— Valeurs de $\rho = \frac{\delta_{1,230}}{\delta_{2,270}}$ notées ρ_a, ρ_b et ρ_c

La figure 2 résume une expérience réalisée avec une solution de collagénase partiellement purifiée (*C. histolyticum* (1)) avec un substrat de collagène épimysial de Veau préparé selon la méthode décrite. On note la très bonne corrélation entre la variation de la DO_{230} et la teneur en hydroxyproline soluble du filtrat.

B. — LE SUBSTRAT

Notre choix s'est porté sur le collagène épimysial du muscle *Longissimus dorsi* de Bovin en raison de la facilité de son prélèvement et de sa préparation et pour la forte teneur en collagène de ce type de tissu.

L'âge de l'animal joue un rôle important, car la vitesse de dégradation du collagène par la collagénase est liée par une relation inverse au degré de réticulation du collagène (c'est-à-dire à

(1) Nous avons réalisé toutes les expériences concernant les collagénases citées dans ce travail avec *C. histolyticum* : Nutritional Biochemicals Corporation.

l'âge de l'animal, GOLL *et al.*, 1964). La localisation anatomique influe également sur cette cinétique enzymatique (nature du muscle, situation intramusculaire ou périmusculaire, tendons, etc). En outre, la taille des éléments du substrat influe sur la vitesse de dégradation (GRANT et ALBURN, 1969). Il importe donc de respecter un certain mode de préparation et en particulier un broyage dans des conditions normalisées.

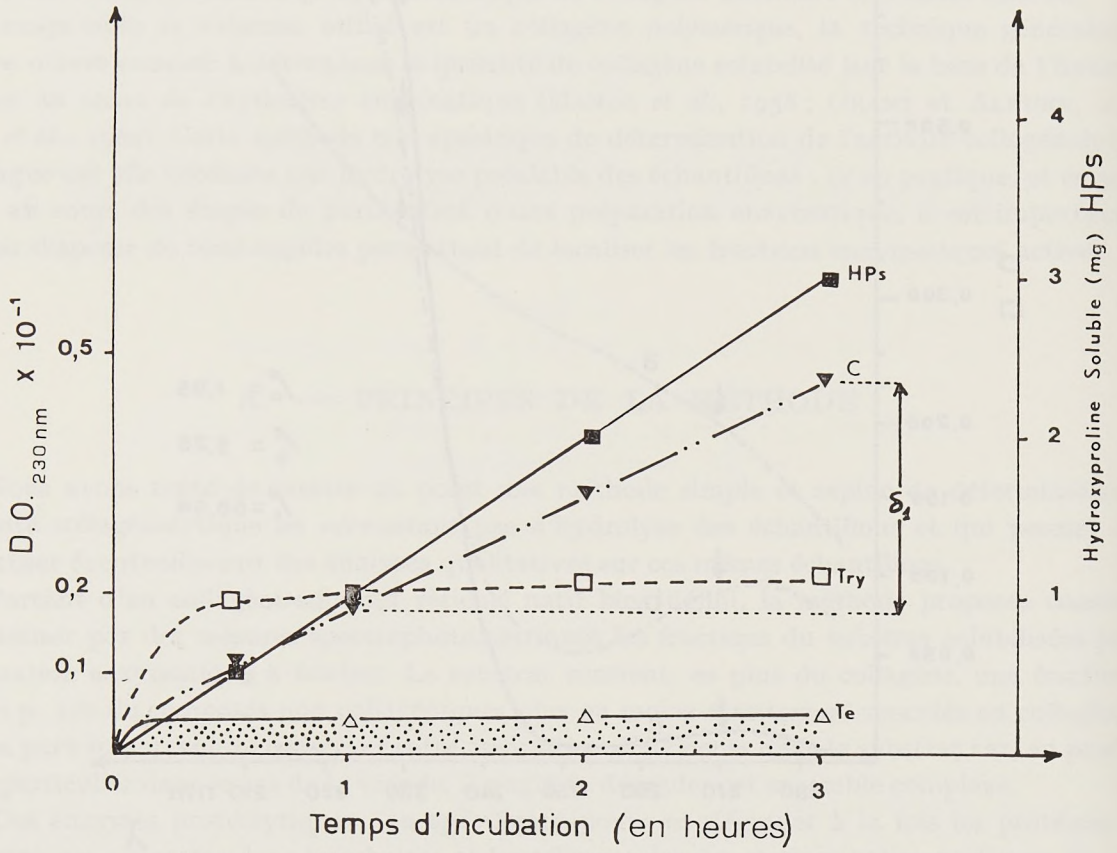


FIG. 2. — *Cinétique de solubilisation* (DO_{230} et hydroxyproline)

Conditions expérimentales

— substrat : collagène épimysial de *Longissimus dorsi* de veau de 3 mois (50 mg/éch.)
— tampon pH 7,4 ; *Tris* HCl 0,04 M ; $CaCl_2$ 0,004 M (10 ml/éch.)
— enzymes : trypsine en poudre (0,50 mg/éch.)
collagénase *C. histolyticum* (0,50 mg/éch.)
— température d'incubation 37°C

Résultats exprimés en

— DO_{230nm} pour Te = témoin collagène + tampon
Try = collagène + trypsine
C = collagène + collagénase
— mg d'hydroxyproline solubilisée (HP_s) pour les échantillons correspondant à C.
(Te et Try ne contiennent pas d'hydroxyproline soluble.)

L'activité collagénolytique qui sera définie par cette méthode sera donc relative à un substrat bien caractérisé. Pour « détecter » cette activité collagénolytique il est possible de choisir un substrat plus ou moins réticulé ; en règle générale les solutions enzymatiques à analyser étant relativement peu actives sans purification préalable, un substrat moyennement réticulé correspondant à un animal de 3-4 ans permet de couvrir une large gamme d'activités.

Préparation

La trame aponévrotique est prélevée sur un muscle de bœuf (ou de vache) de 4 ans (*Longissimus dorsi*) 24 h après l'abattage. Les résidus musculaires adhérant à cette trame sont enlevés et le tissu est coupé en lames de 5 mm puis broyé dans le bac réfrigéré d'un broyeur Robot Coupe.

Ensuite 2 broyages successifs en présence d'eau à + 4°C (P/V = 1/100) sont effectués au broyeur Waring-Blendor (2 cycles de 15 s séparés par un temps de repos de 15 s). La purification se poursuit par 3 opérations de dégraissage à l'acétone à + 4°C (P/V = 1/100) jusqu'à l'obtention d'un chevelu blanc qui est alors séché et dont les caractéristiques moyennes approximatives sont les suivantes :

— teneur en eau résiduelle : 8 à 10 p. 100 ;
— teneur en hydroxyproline : 90 à 100 mg/g ;
— teneur en azote total : 135 à 145 mg/g.

Les échantillons sont conservés sous sachets de polyéthylène clos à + 4°C.

Des contrôles préliminaires effectués sur les fibres du tissu ainsi extrait ont montré que lorsque toutes les opérations ci-dessus sont effectuées à + 4°C, le substrat ne subit pas de dénaturation sensible (les contrôles ont porté sur la température de contraction thermique et la solubilisation par la trypsine).

C. — LE MILIEU D'INCUBATION

Le milieu utilisé pour le test est le tampon *Tris* HCl 0,04 M ; $CaCl_2$ 0,004 M ; pH 7,4. Les ions Ca^{++} sont activateurs des collagénases, mais une trop forte concentration (par ex. 0,3 M $CaCl_2$) entraîne une dénaturation très importante du collagène à 37°C et le rend sensible aux enzymes protéolytiques tels que la trypsine. Par contre, dans le milieu pH 7,4 ; 0,004 M $CaCl_2$, la trypsine ne libère pas d'hydroxyproline à 37°C; le substrat n'est donc pas dénaturé.

D'autre part le milieu ne devra pas contenir de cystéine qui est à la fois un inhibiteur des collagénases (SEIFTER *et al.*, 1970) et un agent augmentant la solubilité thermique du collagène (KOPP, non publié). Une concentration en cystéine de $5 \cdot 10^{-3}$ M diminue de 50 p. 100 l'activité de la collagénase de *C. histolyticum* « crude ». Il convient donc d'adopter le milieu d'incubation : pH 7,4 ; *Tris* HCl 0,04 M ; $CaCl_2$ 0,004 M qui entraîne un minimum de dénaturation du substrat.

D. — RÉALISATION PRATIQUE DU TEST

Pour le test on réalise deux incubations distinctes de 1 et 3 heures pour lesquelles les fins d'incubation se correspondent dans le temps de manière à pouvoir enregistrer les ΔDO_{230} et ΔDO_{270} entre les 2 échantillons.

Chaque échantillon comprend :

— 25 à 50 mg de substrat,

— 10 ml de tampon pH 7,4 *Tris* HCl 0,04 M ; $CaCl_2$ 0,004 M contenant la solution enzymatique (i) à étudier.

Après 1 h et 3 h d'incubation à 37°C dans un bain-marie à agitation, les échantillons sont filtrés et après homogénéisation et équilibrage de la température à 20-22°C (température ambiante) les ΔDO_{230nm} et ΔDO_{270nm} sont enregistrées par différence entre les 2 échantillons :

soit :

$$\delta_1,i = DO_{230}\ (3\ h) - DO_{230}\ (1\ h)$$
$$\delta_2,i = DO_{270}\ (3\ h) - DO_{270}\ (1\ h)$$
$$\rho_i = \frac{\delta_1,i}{\delta_2,i}$$

Interprétation des résultats

— si $\rho_i \simeq 0$, c'est-à-dire $\delta_1,i \simeq 0$: le milieu i ne présente pas d'activité protéolytique pour le substrat ;

— si $\rho_i > 0$
- 1) $\rho_i \simeq 2$: le milieu se comporte comme le tampon seul et ne présente pas d'activité protéolytique ;
- 2) $\rho_i = 5$ à 8 : le milieu présente une activité protéolytique *simple* non collagénolytique (type trypsine) ;
- 3) $\rho_i > 20$, et en particulier $\rho_i \to +\infty$ ($\delta_2 \to 0$) : le milieu présente une activité collagénolytique prédominante (d'autant plus spécifique que ρ_i est plus grand).

Étant donné la faible quantité de protéines non collagéniques présentes dans le substrat, leur dégradation par des protéases simples est en général très rapide et le mode d'étude proposé qui consiste à déterminer les δ (3 h — 1 h) élimine pratiquement toute interférence avec une activité non collagénolytique.

Expression de l'activité spécifique

Lorsque $\delta_1,i > 0$ et $\rho_i > 20$, le milieu i peut être caractérisé par son activité collagénolytique spécifique AS_i ; cette expression permet de comparer entre elles les activités des milieux étudiés.

Nous proposons le mode d'expression suivant :

$$AS_i = \frac{\delta_1,i}{t \times c} \text{ où } \begin{cases} \delta_1,i = DO_{230}\ (i)\ (t_2) - DO_{230}\ (i)\ (t_1) ; \\ t = t_2 - t_1 \text{ en heures } (t_1 \text{ et } t_2 = \text{durées des deux incubations de la préparation } i ;\ t_1 = 1 \text{ heure ou plus}) ; \\ c = \text{concentration } \textit{totale} \text{ en protéines-enzymes dans les 10 ml d'incubation du milieu } i \text{ (méthode Biuret ou Folin).} \end{cases}$$

Exemple de calcul

— substrat : Epimysium vache 4 ans (*Longissimus dorsi*) : 25 mg
— tampon pH 7,4 ; *Tris* HCl 0,04 M ; $CaCl_2$ 0,004 M
— collagénase *C. histolyticum* 0,25 mg protéines enzym./25 mg d'épimysium ;

$$\left.\begin{array}{l} t_1 = 1 \text{ h},\ t_2 = 3 \text{ h} \\ \delta_{1,\,230} = 1{,}150 \\ \delta_{2,\,270} = 0{,}025 \end{array}\right\} \begin{array}{l} \rho = \dfrac{1{,}150}{0{,}025} = 46 \\ AS = \dfrac{1{,}150}{2 \times 0{,}25} = 2{,}30 \end{array}$$

Le temps d'incubation total nécessaire à la détermination de l'activité collagénolytique est évidemment fonction de cette activité ; en règle générale pour des solutions enzymatiques peu actives correspondant à des milieux de culture sans purification préalable, des temps de 3 à 4 heures ($t_2 - t_1 = 2$ ou 3 h) semblent être les plus adaptés. Dans certains cas, et en particulier lorsque le milieu à étudier est très concentré en protéines, il peut être nécessaire de diluer les filtrats d'incubation avec du tampon de référence pour pouvoir effectuer les lectures δ_1,i et δ_2,i ; il faut donc tenir compte de cette dilution dans l'expression de l'activité spécifique.

Il importe de s'assurer que dans tous les cas le substrat se trouve en excès dans le milieu

réactionnel. Pour une quantité de substrat déterminée, la réaction de libération d'hydroxyproline soluble et de variation de la DO_{230} est linéaire jusqu'à la solubilisation d'environ 70 à 75 p. 100 du substrat (mesuré sur la base de l'hydroxyproline).

La méthode proposée trouvant sa pleine application dans des travaux de purification de préparations enzymatiques, il peut être judicieux, lorsque la purification est achevée, de compléter ce test par la détermination, à l'aide du même substrat, de la solubilité du collagène sur la base de l'hydroxyproline et d'exprimer l'activité spécifique de la préparation sous la forme :

AS = mg Hyp. solubilisée/mg Protéine-Enzyme/heure à 37°C

Ce mode d'expression permet une utile confrontation des résultats obtenus dans différents laboratoires.

Reçu pour publication en juin 1971.

SUMMARY

DETERMINATION TEST OF THE REAL COLLAGENOLTIC ACTIVITY

A rapid method for assay of collagenolytic activity with biological substrate is described. The substrate is muscle epimysial collagen washed from sarcoplasmic and myofibrillar proteins and is suspended in 0.04 M *Tris* HCl buffer pH 7.4 containing 0.004 M $CaCl_2$. The incubation temperature is 37°C. Collagenolytic and non specific proteolytic activities are determined by the optical density increase occuring in the filtrate at 230 and 270 nm. An expression of specific collagenolytic activity based on the ΔDO_{230nm}. is proposed. This method is suitable for activity determinations during the purification procedure of crude enzyme preparations.

ZUSAMMENFASSUNG

BESTIMMUNGSVERFAHREN DER WIRKLICHEN KOLLAGENOLYTISCHEN AKTIVITAT

Eine einfache und zeitsparende Methode für die Bestimmung der Kollagenolytischen Aktivität mit biologischen Substrat ist beschrieben. Das Substrat ist getrocknetes Sehnenhautkollagen, und wird in der Bufferlösung pH 7,4 ; 0,04 M *Tris* HCl ; 0,004 M $CaCl_2$ bei 37°C, inkubiert. Kollagenolytische und nicht spezifische proteolytische Aktivitäten werden durch die Zunahme der optischen Dichtigkeit im Filtrat bei 230 und 270 nm bestimmt. Ein Ausdruck der spezifischen Kollagenolytischen Aktivität auf Grund der optischen Dichtigkeitzunahme bei 230 nm wird in Vorschlag gebracht. Diese Methode ist für die Aktivitätsbestimmungen innerhalb der Reinigungsstufen enzymischen Präparaten geeignet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Goll D. E., Hoekstra W. G., Bray R. W., 1964. Age-associated changes in Bovine muscle connective tissue. I. Rate of hydrolysis by collagenase. *J. Food Sci.*, **29**, 608-614.

Grant N. H., Alburn H. E., 1959. Studies on the collagenase of *Clostridium histolyticum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 246.

Heidrich H. G., Prokopova D., Hannig K., 1969. The use of synthetic substrates for the determination of mammalian collagenases. Is collagenolytic activity present in mitochondria ? *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, **350**, 1430.

Kang A. H., Nagai Y., Piez K. A., Gross J., 1966. Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadpole. *Biochemistry*, **5**, 510.

Manahan J., Mandl I., 1968. Primary structure of insoluble tendon collagen. III. Analysis of products of tryptic digestion of native collagen. *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 27.

MANDL I., ZIPPER H., FERGUSON L. T., 1968. *Clostridium histolyticum* collagenase : its purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 465.

SAKAÏ T., GROSS J., 1967. Some properties of the products of reaction of tadpole collagenase with collagen. *Biochemistry*, **6**, 521.

SCHAUB M. C., STRAUCH L., 1965. Cité par HEIDRICH *et al.*, 1969. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1435.

SEIFTER S., TAKAHASHI S., HARPER E., 1970. Further demonstration that cysteine reacts with the metal component of collagenase. *Biochem. biophys. Acta*, **214**, 559.

STARK M., KÜHN K., 1968. The properties of molecular fragments obtained on treating calfskin collagen with collagenase from *Clostridium histolyticum*. *Europ. J. Biochem.*, **6**, 534.

WALDVOGEL F. A., SWARTZ M. N., 1969. Cité par HEIDRICH *et al.*, 1969. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1435.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (2), 193-194.

CHRONIQUE DES LIVRES

HULME (A. C.). — THE BIOCHEMISTRY OF FRUITS AND THEIR PRODUCTS. vol. I. — London, New York, Academic Press, 1970, 620 p.

Ce premier volume sur la biochimie des fruits énumère les groupes de composés constituants chimiques de la plante et leur rôle spécifique dans le métabolisme des fruits. Les constituants étudiés sont : les sucres, les pectines, les acides organiques, les protéines et acides aminés, les enzymes, les lipides, les composés volatils réalisant l'arôme des fruits, les phénols, les carotènes et les triterpènes, les vitamines.

Une deuxième partie est consacrée à la croissance et aux facteurs précédant la récolte, avec une étude sur la physiologie et la nutrition des fruits au cours de leur développement, et le rôle des hormones dans la croissance et le développement.

La biochimie de la maturation et du mûrissement constitue une troisième partie qui comporte l'étude du rôle de l'éthylène, de l'activité respiratoire et son influence sur la composition chimique.

Deux articles sont consacrés aux maladies physiologiques des fruits après la récolte, l'un d'eux étudiant particulièrement l'échaudage des pommes (Apple scald) : symptômes, modifications histologique et biochimique, période sensible et causes.

Chacun des articles présente une bibliographie. Un index auteur et un index matière complètent cet ouvrage.

M. F.

ACTIVITÉS VITAMINIQUES ET TECHNOLOGIE DES DENRÉES ALIMENTAIRES. — COMPTE RENDU DES JOURNÉES SCIENTIFIQUES DU CENTRE NATIONAL DE COORDINATION DES ÉTUDES ET RECHERCHES SUR LA NUTRITION ET L'ALIMENTATION, PARIS, 21-24 AVRIL 1969. — Paris, Éditions du Centre national de la Recherche scientifique, 1970, 552 pages.

Si la quantité des vitamines dont la présence est nécessaire dans la ration alimentaire est très faible par rapport à celle des autres constituants de celle-ci, leur présence n'en est pas moins indispensable ; des troubles de toute nature peuvent apparaître dans l'organisme qui en est privé ou n'en reçoit que des doses insuffisantes.

Chaque jour voit s'accroître l'importance de ces facteurs nutritionnels. Des études récentes ont montré que les vitamines possédaient des pouvoirs multiples et ne se limitaient pas à jouer le rôle de coenzymes : participation à la synthèse d'hormones et d'autres vitamines, contrôle de l'intégrité structurale de la cellule et des organites intracellulaires, intervention dans les processus de reproduction ; toutes ces nouvelles données ainsi acquises nécessitaient donc une mise au point.

D'autre part, ces dernières années ont vu apparaître, en fonction de différents impératifs économiques et sociaux, de nouveaux procédés de production et de conservation de presque toutes les denrées alimentaires et la question s'est alors légitimement posée de savoir si la mise en œuvre de ces nouvelles techniques n'entraînait pas un appauvrissement de la richesse en vitamines des produits offerts aux consommateurs.

Ce sont ces deux points dont une étude approfondie fit l'objet du colloque sur « Activités vitaminiques et Technologie des Denrées alimentaires » dont ce volume publie les travaux. Chaque rapport est accompagné d'une importante bibliographie et suivi de la discussion à laquelle son exposé a donné lieu.

An. Éd.

Troisième congrès mondial de la Recherche agronomique organisé et édité par le Centre international pour la Coopération des Recherches en Agriculture, sur le Thème « Techniques agricoles modernes et Santé humaine ». — Rome, 1-5 décembre 1969.

Ce 3e congrès mondial de la recherche agronomique a été préparé par quatre symposiums qui se sont déroulés de 1964 à 1968. Le premier s'est tenu à Paris : « Étude de la composition de la matière végétale », le second à Naples, « Effet des herbicides et des pesticides sur la composition des végétaux », le troisième à Dublin, « Étude de l'influence des agents de conservation et de transformation sur la composition des denrées ».

Les sujets abordés au cours de ce congrès sont centralisés autour des rapports généraux suivants :

Braconnier R. : Les problèmes de l'alimentation et les techniques actuelles de l'agriculture et des industries agricoles par rapport à la santé humaine : aspects du point de vue de l'hygiéniste et du nutritioniste.

Von Boguslawski E : Les techniques de la production végétale et la satisfaction des besoins humains.

Walsh T. : Les techniques de la production animale et la satisfaction des besoins humains.

Rotini O. : Les techniques de conservation et de transformation et la satisfaction des besoins humains.

Jelenic D. : Les techniques actuelles de l'agriculture et des industries agricoles et les recommandations en vue de leur amélioration.

J. L.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé :* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions ;* f) *résumé* anglais ou destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques*.

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet*. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve a corriger.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Oenologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en Josas. On demande deux exemplaires.

Technologie agricole.

Le directeur de la publication: M.-L. Cagnac

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 12-1971

Dépôt légal: 4e trimestre 1971. N° d'impression: 1355.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1971

Vol. 20 . N° 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (3), 199-215.

MÉTHODE DE VINIFICATION PAR MACÉRATION CARBONIQUE

VI. — ÉLABORATION DES VINS BLANCS SECS

P. BÉNARD, M. BOURZEIX, M. BURET, C. FLANZY et J. MOURGUES
avec la collaboration technique de J. LARDIN, P. PERRY, M. SABATIER et A. SOLANO

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A.,
11 - Narbonne

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84 - Montfavet

RÉSUMÉ

Des essais de vinification par macération carbonique ont été réalisés en vue d'obtenir des vins blancs bouquetés et suffisamment acides. Sur la base de quatre cépages, il s'avère qu'une macération carbonique de 48 heures est suffisante, à condition de réaliser rapidement l'anaérobiose par le CO_2 et d'opérer à une température adaptée au cépage, en évitant le contact entre le moût de goutte et la vendange. Le tartricage peut éventuellement conduire à des résultats positifs. Au cours des soutirages, le contact avec l'air doit être évité.

Mots clés : *vinification, macération carbonique, vins blancs.*

I. — INTRODUCTION

Le bouquet et la saveur des vins rouges élaborés par macération carbonique sont généralement plus développés que ceux de vins témoins obtenus après foulage de la vendange (CHARNAY, 1958). Les qualités organoleptiques des vins blancs peuvent-elles, à leur tour, être améliorées par cette technique de macération carbonique qui fait appel à la fermentation intracellulaire des baies de raisin placées en anaérobiose ?

Les résultats obtenus en vinification en rouge ne sont pas transposables, sans études préalables, au cas de la vinification en blanc. En effet, à côté d'un apport aromatique important, la fermentation intracellulaire des raisins provoque un abais-

sement sensible de l'acidité du milieu (FLANZY *et al.*, 1967) et une extraction non négligeable de matières polyphénoliques (FLANZY, BURET, 1970). Si ces différentes actions sont souvent souhaitables dans le cas de vins rouges, elles peuvent devenir gênantes dans certains vins blancs que l'on désire « frais » (acides) et de nuance agréable.

Nous cherchons à préciser les conditions dans lesquelles cette technique est utilisable pour l'élaboration de vins blancs « fruités », présentant une acidité et une coloration satisfaisantes. Dans ce but, des essais sont conduits depuis 7 ans sur des cépages méridionaux. Les résultats obtenus, et plus particulièrement ceux des deux dernières campagnes, font l'objet de ce mémoire.

Nous utiliserons les abréviations suivantes : MC = macération carbonique ; Témoin = vin élaboré selon les techniques courantes.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

L'expérimentation a été conduite au Domaine expérimental de Pech-Rouge, I. N. R. A. (Gruissan, Aude), à partir des raisins de 4 cépages à raisins blancs : *Carignan, Grenache, Terret, Maccabeu*.

De 1964 à 1968, les essais ont porté sur la comparaison de la vinification habituelle des vins blancs (vinification témoin) et de la vinification avec MC. En outre, des essais de soutirage et de conservation sous différents gaz ont été effectués.

En 1969 et 1970, la comparaison des deux types de vinification a été complétée par l'étude des influences respectives de l'anhydride sulfureux et de l'acide tartrique ajoutés à la vendange dans le but d'élever l'acidité finale du vin.

Les conditions expérimentales sont consignées dans les tableaux 1 et 2.

A la récolte, la vendange a été répartie en lots homogènes suivant la technique d'échantillonnage de BÉNARD et JOURET (1963) ; les lots ont été amenés à la cave sans foulage préalable.

Vinifications témoins

De 1964 à 1966, la vendange a été foulée, puis égouttée et pressée dans un pressoir horizontal à rebêchage automatique. Moûts de goutte et de presse se sont déversés dans une cuve dont l'atmosphère avait été saturée en CO_2. La totalité du moût (goutte + presse) a été sulfitée à raison de 5 g d'anhydride sulfureux par hectolitre et mise en fermentation, à la température ambiante, dans des cuves de 50 hl préalablement remplies de CO_2.

De 1967 à 1970, les raisins entiers ont été directement pressés dans le pressoir, lui-même dans une enceinte de matière plastique (un serrage supplémentaire de 5 kg/cm² a été réalisé). L'atmosphère de cette enceinte a été saturée de CO_2 d'une façon continue. Pour les vendanges 1967 et 1968, le reste des opérations s'est déroulé comme les années précédentes.

En 1969, le moût total a été divisé en deux parties : l'une recevant une addition de 10 g/hl de SO_2, l'autre fermentant sans aucun apport. Un levain de *Saccharomyces oviformis* a été apporté aux deux échantillons.

En 1970, la totalité du moût a reçu 5 g d'anhydride sulfureux par hectolitre et a été partagée en deux lots dont le premier a été additionné d'acide tartrique à raison de 1,5 g/l. Après levurage, les deux lots ont été mis en fermentation dans des cuves de 6 hl, à une température variant entre 21 et 23°C, sans addition de CO_2.

Vinifications par macération carbonique

La vendange a été encuvée, sans foulage ni pressurage, dans des cuves dont l'atmosphère a été saturée en CO_2 avant et après remplissage. Afin d'éviter une trop grande dissolution de substances polyphénoliques dans le moût, la durée de macération a été limitée. Ainsi, après 2 ou 3 jours, à la température ambiante (sauf en 1970 où le récipient vinaire a été placé dans une

TABLEAU I

Données relatives aux expérimentations de 1964 à 1968

Année	Cépages p. 100	Technique de vinification	Poids de raisins (kg)	Fermentation intracellulaire		Fermentation après pressurage		Moût goutte (hl)	Moût presse (hl)	$\frac{\text{Goutte}}{\text{Total}} \times 100$ (Total = goutte + presse)	Rendement $\frac{\text{kg vendange}}{\text{hl moût}}$
				durée heures	θ°C	durée jours	θ°C				
1964	*Carignan* 70	Témoin : foulage-égouttage-pressurage. SO_2 = 5 g/hl	3 970			9	23-28		32		124
	Grenache 30	MC puis pressurage	4 000	48	23-25	7	23-28	7,5	25	23	123
1965	*Carignan* 45	Témoin : foulage-égouttage-pressurage. SO_2 = 5 g/hl	3 850			25	19,5-23		29		133
	Grenache 55	MC puis pressurage	3 723	48	16-17	23	16-23,5	5	23,5	17,5	130
1966	*Carignan* 50	Témoin : foulage-égouttage-pressurage. SO_2 = 5 g/hl	3 800			12	21-27		29		131
	Grenache 30 *Terret* 20	MC puis pressurage	3 637	72	21-29	9	21-26,5	5,5	22	20	132
1967	*Carignan* 50	Témoin : pressurage sous CO_2 SO_2 = 5 g/hl	3 176			12	21-26		24		132
	Grenache 50	MC puis pressurage sous CO_2	3 186	64	20-21	9	20,5-26,5	4,8	20,7	19	125
1968	*Carignan* 55	Témoin : pressurage sous CO_2 SO_2 = 5 g/hl	3 916			13	21-27		29		132,5
	Grenache 45	MC puis pressurage sous CO_2	3 891	72	19-20	10	21,5-27	5	27,5	15,3	—

TABLEAU 2

Données relatives aux expérimentations 1969 et 1970

Année	Cépages p. 100	Technique de vinification	Poids de raisin (kg)	Fermentation intracellulaire		Fermentation après pressurage		Moût goutte (hl)	Moût presse (hl)	Goutte / Total × 100 (Total = goutte + presse)	Rendement kg vendange / hl moût
				durée heures	θ° C	durée jours	θ° C				
1969	*Carignan* 50 *Grenache* 50	Témoin = pressurage sous CO_2 SO_2 : 10 g/hl	1 849			8	22-27		14,5		127
		Témoin = pressurage sous CO_2				8	23-27				
		MC = pressurage sous CO_2 SO_2 : 10 g/hl	1 878	60	23-25	9	24-29	2,50	12,5	20	125
		MC = pressurage sous CO_2		60	23-25	8	24-29				
1970	*Maccabeu* 90 *Terret* 10	Témoin = pressurage sous CO_2 SO_2 = 5 g/hl ac. tartrique = 150 g/hl	2 122			14	21-23		16,5		128
		Témoin = pressurage sous CO_2 SO_2 = 5 g/hl				14	21-23				
		MC = pressurage sous CO_2 SO_2 = 5 g/hl ac. tartrique = 150 g/hl	2 122	48	35	12	21-23	2	13,5	13	136
		MC = pressurage sous CO_2 SO_2 = 5 g/hl		48	35	12	21-35				

enceinte thermostatée à 35°C avec apport continu de CO_2 dans la cuve durant les 48 heures de macération), les cuves ont été égouttées et la vendange pressée.

A partir de 1967, les pressurages ont eu lieu en atmosphère de CO_2.

Jusqu'en 1968, les moûts n'ont pas été sulfités, contrairement aux moûts témoins. En 1969 et 1970, les moûts de MC subissent les mêmes traitements que les moûts témoins correspondants.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. — *Caractéristiques des fermentations*

La durée totale de fermentation est sensiblement la même pour les deux techniques de vinification.

Dans les six premiers essais, nous observons, en outre, que la densité des moûts provenant du pressurage des vendanges soumises à la MC a été généralement plus élevée que celle des moûts Témoins correspondants et fermentant depuis 2 ou 3 jours.

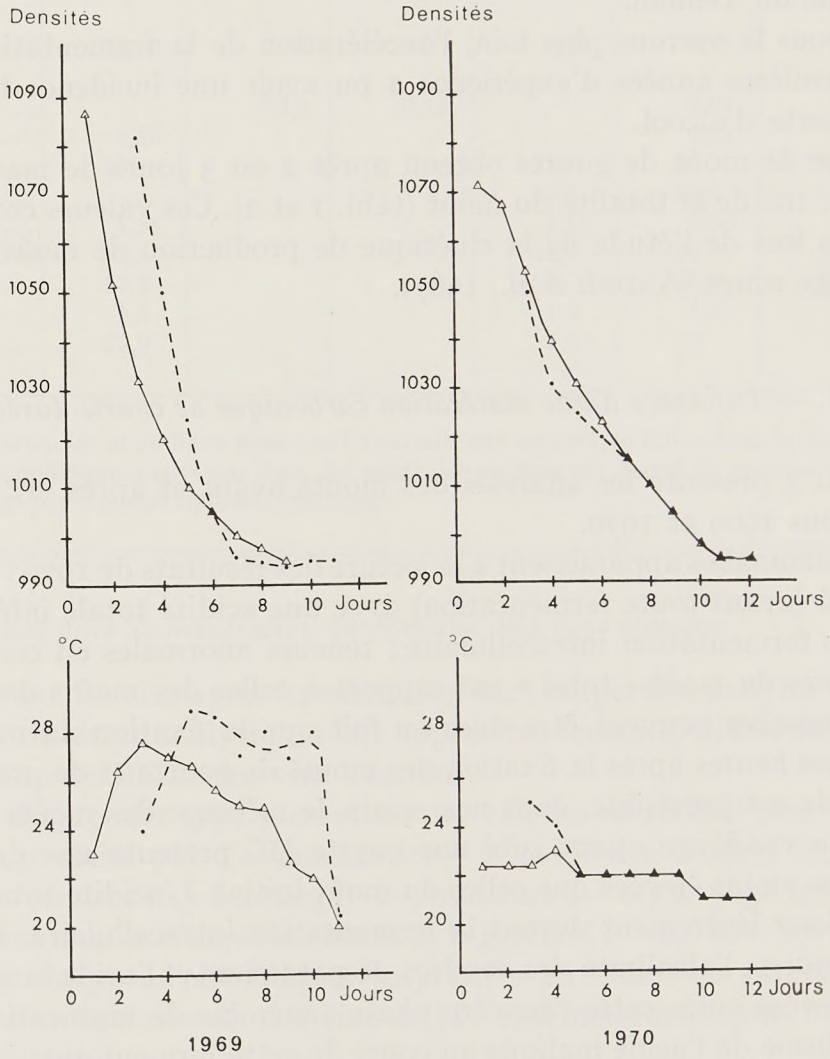


FIG. 1. — *Évolution des densités des moûts et des températures au cours de fermentations par les microorganismes*

1969 : Échantillons sans SO_2
1970 : Échantillons sans acide tartrique
△——△—— Témoin
—·— —·— MC

Le phénomène observé traduit une différence dans les vitesses respectives de transformation des sucres par fermentation intracellulaire et par fermentation levurienne. Une telle différence peut être partiellement expliquée par le fait que, dans les premières 48 ou 72 heures d'expérience, la température du moût Témoin a été, le plus souvent, supérieure à la température (20°C environ) de la vendange subissant la fermentation intracellulaire. Puisque, d'une part les durées de fermentation sont égales et que, d'autre part, les densités des moûts MC au pressurage sont supérieures à celles des moûts Témoins le même jour, la phase fermentation levurienne du moût MC doit être accélérée par rapport à celle du moût Témoin. En corollaire, la température de fermentation du lot MC doit être plus élevée que celle du Témoin.

Ces deux propositions sont bien mises en évidence dans l'essai 1969 (fig. 1). En revanche, en 1970 la température élevée (35°C) de l'enceinte où se trouvait la cuve de MC a permis d'obtenir, au pressurage, un moût dont la densité était sensiblement égale à celle du Témoin (fig. 1). Puis le maintien de la température de fermentation des deux cuves à 22°C a facilité le réajustement de la cinétique de fermentation du lot MC sur celle du Témoin.

Comme nous le verrons plus loin, l'accélération de la fermentation du lot MC dans les 6 premières années d'expérience a pu avoir une incidence importante en causant une perte d'alcool.

Le volume de moût de goutte obtenu après 2 ou 3 jours de macération varie de 17,5 à 23 p. 100 de la totalité du moût (tabl. 1 et 2). Ces valeurs correspondent à celles obtenues lors de l'étude de la cinétique de production de moût de goutte en MC de vendange rouge (André *et al.*, 1967).

B. — *Influence d'une macération carbonique de courte durée*

Le tableau 3 présente les analyses des moûts avant et après MC au cours des expérimentations 1969 et 1970.

Certaines anomalies apparaissent à la lecture des résultats de 1970 : faible densité du moût initial (avant toute fermentation) avec une acidité totale inférieure à celle du moût après fermentation intracellulaire ; teneurs anormales en cendres et alcalinité des cendres du moût « total » par rapport à celles des moûts de goutte et de presse. Ces anomalies peuvent être dues au fait que la fixation du moût total est réalisée quelques heures après la fixation des moûts de goutte et de presse.

Comme cela est prévisible, dans nos essais, le mélange des moûts de goutte et de presse d'une vendange ayant subi une courte MC présente une densité et une teneur en sucres moins élevées que celles du moût initial. L'acidité totale des moûts doit, aussi, baisser légèrement durant la fermentation intracellulaire. En revanche, le poids des cendres, l'alcalinité des cendres, le potassium et l'acide tartrique ont des valeurs plus élevées après cette première phase anaérobie de vinification.

Le catabolisme de l'acide malique au cours de cette fermentation intracellulaire de 48 heures à 35°C est nettement mis en évidence par la diminution (environ 20 p. 100) de la teneur du moût de presse en cet acide par rapport à la teneur correspondante du moût initial. Ce résultat confirme ceux obtenus dans les essais conduits à l'échelon laboratoire (Flanzy *et al.*, 1967).

La quantité d'acide malique retrouvée dans le moût de goutte semble indiquer que l'action de la fermentation malolactique a été limitée durant cette anaérobiose carbonique.

TABLEAU 3

Analyse des moûts avant et après macération carbonique

	1969			1970			
	Moût initial	Moûts après M C		Moût initial	Moûts après MC		
		Goutte	Mélange		Goutte	Presse	Mélange
Densité à 15°C ...	1 088,4	1 090,7	1 085,9	1 069,6	1 065,6	1 065,8	1 065,6
Degré alc. en puissance (°GL)	12°4			8°95			
Degré alc. acquis .		0°35	0°45		1°10	0°70	0°83
Sucres (g/l)		208	195	160	137	144	142
Acidité totale (SO_4H_2 g/l) ..	5,40	5,20	5,0	4,90	5,15	5,0	5,10
Acidité volatile (SO_4H_2 g/l) ..		0,19	0,11		0,02	0,04	0,02
pH	3,35				3,34	3,35	3,32
Acide tartrique ...	96			99	96	110	110
Acide malique				55,5	50,4	45,8	46,7
Cendres	4,31			4,10	4,30	4,40	4,8
Alcalin. des cendres	49,8			51,8	54,0	54,0	55,0
Potassium	53,8			53	54,6	56,5	54,6
Sodium	1,4			1,3	1,2	0,7	0,7
Calcium	27,9			7,9	12	7,4	6,6

Les acides tartrique et malique ainsi que l'alcalinité des cendres, le Potassium, le Sodium et le Calcium sont exprimés en milliéquivalents par litre. Le poids des cendres est donné en grammes par litre. L'acide malique a été dosé par une méthode enzymatique.

Comparaison des vins de macération carbonique aux vins témoins.

Les analyses des vins après fermentation sont rapportées dans les tableaux 4 et 5. L'examen des résultats analytiques fait apparaître certaines différences dans la composition des vins de MC et des vins Témoins.

Les vins du premier type présentent des valeurs en général plus élevées pour le pH (0,10 à 0,30 unité pH d'augmentation), le poids des cendres (0,00 à 0,60 g/l), l'alcalinité des cendres (0,5 à 2 méq/l), le potassium (— 0,7 à + 31 méq/l) et pour les quatre dernières années d'expérimentation, le glycérol (— 0,6 à + 2,6 g/l). De même, les teneurs en composés phénoliques (exprimées en indice de permanganate ou en acide gallique) et en flavonols des vins de MC sont nettement plus importantes que celles des Témoins.

En revanche, compte non tenu des résultats 1969, les vins Témoins ont une acidité fixe supérieure de 0,1 à 1,9 g/l en SO_4H_2. Ils sont plus riches en acide tartrique (0 à 14 méq/l), en acide malique (20 à 25,4 méq/l), en extrait sec (1 à 3 g/l), en acétaldéhyde (8 à 33 mg/l), en fer (1 à 9 mg/l) et parfois, en azote total (20 à 50 mg/l).

TABLEAU 4

Analyse des vins des expérimentations de 1964 à 1968

	Vins 1964 Analyse du 30-10-64		Vins 1965 Analyse du 13-1-66		Vins 1966 Analyse du 15-12-66		Vins 1967 Analyse du 15-10-67		Vins 1968 Analyse du 12-12-68	
	Témoin	MC	Témoin	MC	Témoin	MC	Témoin	MC	Témoin	MC
Densité à 15°C	992,4	993,6	992,9	991,2	991,5	991,2	992,9	992,9	992,6	992,3
Degré alcoolique (°GL)	11°6	11°2	12°4	12°2	12°3	12°1	10°95	10°65	10°95	10°8
Acidité totale (SO_4H_2 g/l)	4,6	3,2	4,2	3,3	4,4	3,5	4,4	3,6	4,4	3,1
Acidité volatile (SO_4H_2 g/l)	0,20	0,25	0,30	0,24	0,24	0,36	0,20	0,31	0,24	0,29
Acidité fixe (SO_4H_2 g/l)	4,4	2,95	3,90	3,26	4,16	3,14	4,20	3,29	4,16	2,81
pH	3,55	3,73	3,30	3,40	3,40	3,60	3,22	3,43	3,30	3,60
Extrait sec à 100°C (g/l)	—	—	17,4	14,7	17,4	15,5	16,5	15,3	15,6	13,1
Cendres (g/l)	2,1	2,7	1,6	1,8	1,9	1,9	2,0	2,2	1,8	2,1
Alcalinité des cendres (méq./l)	30,2	31,0	20,0	20,7	22,7	24,2	22,5	23,5	22,5	23,5
Sucres (g/l)	1,2	1,3	4,1	1,3	0,9	1,3	0,9	1,4	1,2	0,7
Acide tartrique (méq./l)	32	28,2	28,0	22,0	37,3	29,3	53,3	43,3	40	26
Acide malique (méq./l)	22,6	1,5	—	—	27,9	2,5	23,2	3,2	—	—
Glycérol (g/l)	—	—	7,4	7,6	6,7	6,6	7	6,9	6,3	7,9
Azote (mg/l)	134,0	105,0	98,0	98,0	95,2	75,6	98	98	203	154
Aldéhydes (mg/l)	42,0	8,8	42,2	29,9	26,4	14,0	24,6	8,8	35,2	14,0
Fer (mg/l)	8,4	7,0	10,1	8,2	11,7	8,4	13	10	—	—
Cuivre (mg/l)	0,1	0,1	0,3	traces	0,5	0,7	0,4	0,4	0,4	0,2
Potassium (méq./l)	—	—	16,8	18,3	22,0	23,5	23,3	26,4	23,0	22,3
Sodium (méq./l)	—	—	1,8	0,9	1,5	0,8	0,7	0,9	1,2	0,9
Magnésium (méq./l)	—	—	6,3	5,9	4,5	3,5	4,3	7	5,6	5,0
Calcium (méq./l)	—	—	3,9	4,0	3	3,6	7,2	7,3	6	3,9
Indice de permanganate (méq./l)	4	7,5	5	7,2	5,5	7,5	3,5	5	—	—
Flavonols (mg rutine/l)					4,6	9,1	10,9	24,9	3,64	10,93
Folin-Denis (mg d'acide gallique/l)							100	147	111	173

TABLEAU 5

Analyse des vins des expérimentations 1969 et 1970

	Vins 1969 — Analyses : 3-11-1969				Vins 1970 — Analyses : 21-10-1970			
	Témoin SO_2	Témoin	MC SO_2	MC	Témoin ac. tartrique	Témoin	MC ac. tartrique	MC
Densité à 15°C	993,6	992,9	993,9	993,3	993,2	991,1	993,4	993
Degré alcoolique (°GL)	10°3	10°3	10°05	10°05	10°05	10°	10°	10°10
Acid. totale (SO_4H_2 g/l)	4,40	3,60	3,55	3,50	5,40	4,60	4,90	4,20
Acid. volatile (SO_4H_2 g/l)	0,20	0,25	0,15	0,15	0,25	0,35	0,15	0,10
Acid. fixe (SO_4H_2 g/l)	4,20	3,35	3,40	3,35	5,15	4,15	4,75	4,10
pH	3,22	3,33	3,37	3,40	3,05	3,17	3,15	3,31
Extrait sec à 100°C (g/l)	15,7	12,05	15,3	14,90	15,2	14,3	15,25	14,20
Cendres (g/l)	2,20	2,05	2,3	2,1	1,45	1,55	1,35	1,80
Alcalinité des cendres (méq./l)	26	25,2	26,5	26	16	18,5	15,5	20,5
Sucres (g/l)	1,00	0,90	1,1	1,1	0,50	0,40	1,50	1,0
Ac. tartrique (méq./l)	45	40	38	40	48	34	48	32
Ferm. malolactique	en cours	++	en cours	en cours				
Glycérol (g/l)	7,9	7,35	7,28	9,96	6,07	6,0	7,5	7
Azote (mg/l)	70	63	91	84	35	49	56	49
Aldéhydes (mg/l)	49,2	14	37	27,1	42	31,7	33,4	22,9
Fer (mg/l)	27,6	17,9	15	16,2	17,84	16,1	9	9,4
Cuivre (mg/l)	0,30	0,4	0,3	0,2	0,30	0,2	0,4	0,2
Potassium (méq./l)	21,4	21,6	23,5	24,4	12,5	16,4	14,3	18,4
Sodium (méq./l)	1,1	1,1	1,1	1,3	0,7	0,7	0,6	0,5
Calcium (méq./l)	6,1	5,2	5	5,2	6,3	6,2	5,9	5,2
SO_2 total (mg/l)	45	12	58	12				
SO_2 libre (mg/l)	traces	traces	12	traces				

L'abaissement d'acidité fixe des vins de MC par rapport à celle des témoins est lié aux différences de leurs teneurs respectives en acides tartrique et malique. Ces différences pourraient être dues à deux phénomènes.

D'une part, la fermentation intracellulaire des baies, durant les 2 ou 3 jours d'anaérobiose carbonique, au cours de laquelle l'acide malique et, peut-être, l'acide tartrique, sont partiellement métabolisés (FLANZY *et al.*, 1967) ; cependant, il est douteux que la fermentation intracellulaire puisse, en aussi peu de temps et aux températures d'expérience, provoquer des chutes quantitatives importantes de ces acides.

D'autre part, la fermentation malolactique qui s'est déclenchée très rapidement en MC (dans les 5 premières années d'expérimentation) alors qu'elle ne s'est pas produite dans les Témoins sulfités. L'aptitude particulière des vendanges vinifiées en raisins entiers à subir facilement l'action des bactéries lactiques au cours de la phase de fermentation par les levures (ANDRÉ, FLANZY, 1967) provient d'un ensemble de facteurs dont font partie : l'absence de SO_2, l'élévation du pH, les apports d'éléments biotiques au milieu par la fermentation intracellulaire (BARRE, 1969).

Cet ensemble de données semble montrer que les vins de MC sont moins riches en acides organiques libres et légèrement plus riches en cations minéraux (K principalement), donc en acides organiques combinés.

Il est intéressant de noter que le degré alcoolique des vins de MC est inférieur à celui des vins Témoins, de 0°20 à 0°40, pour les essais où la température de fermentation n'a pas été régulée. En revanche, en 1970, les deux types de vinification ont été conduits à la même température dans la phase de fermentation par les levures, et les degrés alcooliques acquis sont sensiblement identiques pour les différents échantillons.

Les pertes observées dans les vins des années précédentes sont vraisemblablement dues au fait qu'en MC les phénomènes fermentaires deviennent rapides après le pressurage et provoquent, avec une légère élévation de température, un dégagement accéléré de CO_2 lui-même entraînant des composés volatils (JOURET, MOUTOUNET, 1970).

C. — *Influence de l'anhydride sulfureux*

La comparaison des couples de vins 1969 « Témoin-Témoin avec SO_2 » et « Macération carbonique-Macération carbonique avec SO_2 » met en évidence, comme cela était prévisible, une augmentation importante de la quantité d'acétaldéhyde dans les vins provenant de vendange sulfitée (tabl. 4). Il n'apparaît pas d'autre influence nette du sulfitage sur la composition des vins.

D. — *Influence du tartricage*

L'apport d'acide tartrique à la vendange a provoqué, outre l'augmentation de cet acide (15 méq/l) dans les vins correspondants par rapport aux vins non tartriqués, une élévation de l'acidité fixe (0,7 à 0,9 g/l en SO_4H_2), de l'extrait sec (1 g/l) et de l'acétaldéhyde (10 mg/l) (tabl. 4). Le pH des vins enrichis en acide tartrique est abaissé (0,15 unité pH) ainsi que leur alcalinité des cendres (2,5 à 5 méq/l) et leur teneur en potassium (4 méq/l). Une légère diminution du poids des cendres est notée dans ces vins.

TABLEAU 6

Évolution des potentiels redox des vins
(E_H en mV à 20°C)

	Vins 1965				Vins 1966					Vins 1967				
	26-8-65	12-1-66 Soutirage		17-3-66	29-11-66	16-12-66 Soutirage		18-1-67	8-5-67	19-9-67	11-10-67 Soutirage		5-1-68	10-5-68
		Avant	Après			Avant	Après				Avant	Après		
Témoin	298	300	313	285	283	292	312	298	270	114	100	123	225	332
MC	239	289	309	262	276	304	332	310	254	128	126	188	268	268

E. — *Potentiel redox*

a) *Évolution comparée des potentiels redox des vins.*

Les potentiels redox des vins de 1965, 1966, 1967, ont été mesurés à la fin des fermentations et quelques mois plus tard, avant et après soutirage (tabl. 6).

En 1965 et 1966, les vins de MC présentent, après achèvement de la fermentation alcoolique, des potentiels plus bas que ceux des vins témoins. Nous avons pensé que cette différence était due, en partie, aux modalités de pressurage de la vendange. En effet, bien que cette opération ait été effectuée dans les mêmes conditions d'aération pour les deux types d'échantillons, le lot MC a pu être relativement isolé de l'atmosphère de la cave par le CO_2 emmagasiné dans les baies au cours de la fermentation intracellulaire (CHAMBROY, FERRY, FLANZY, 1970) et désorbé durant le pressurage. Aussi, dans le but de réduire les phénomènes oxydatifs dans les premiers stades de la vinification, avons-nous réalisé à partir de 1967 tous les pressurages sous gaz carbonique. Les mesures effectuées en 1967 montrent, au contraire, que le potentiel du vin témoin est plus bas que celui du vin de MC. Cependant, cette unique mesure ne permet pas de dire que l'emploi de CO_2 exogène au pressurage est plus efficace qu'une fermentation intracellulaire préalable, quant à l'abaissement du potentiel oxydo-réducteur des vins.

Les résultats précédents sont en concordance avec ceux de SCHAEFFER (1968) sur l'effet antioxydant du CO_2 utilisé au pressurage.

L'augmentation du potentiel des vins MC, entre la fin de la fermentation et la fin du soutirage, est nettement plus importante que celle des Témoins. Aussi, en fin de soutirage, le potentiel MC est-il égal ou supérieur au potentiel « Témoin ». Inversement, après un certain temps de conservation, le niveau du potentiel MC est plus bas que celui du potentiel Témoin.

b) *Influence de l'atmosphère de soutirage et de conservation des vins sur leur potentiel redox.*

Les soutirages sous argon, azote ou anhydride carbonique (tabl. 7) provoquent des augmentations, légères et variables selon l'année, du potentiel redox. Il n'y a pas de différences significatives d'action entre ces différents gaz. En revanche, les soutirages avec aération, en 1967 et 1968, entraînent pour les vins de MC des augmentations respectives de 131 et 123 mV, avec un taux d'oxygène dissous de 3,55 et 3,80 mg/l. Ces dernières valeurs concordent avec celles obtenues pour les vins rouges (MOURGUES *et al.*, 1967).

Au septième mois de conservation à 15°C (± 2°), les vins sous argon, azote ou CO_2 ont sensiblement le même potentiel, mais les vins soutirés et conservés à l'air conservent toujours des potentiels plus élevés. En 1968, le vin de MC soutiré et conservé à l'air est au même niveau de potentiel redox que le vin témoin soutiré et conservé sous argon.

Ainsi, l'utilisation de gaz inertes pour le soutirage et la conservation des vins permet de limiter l'augmentation du potentiel redox de ces vins au cours de leur maturation. L'intérêt de cette technique sur le plan qualitatif a été souligné par JAULMES et HAMELLE (1969).

TABLEAU 7

Évolution des potentiels redox des vins en fonction de la nature de l'atmosphère de soutirage et de conservation

(E_H en mV à 20°C)

Nature du récipient	Gaz de soutirage et conservation	Vins 1967				Vins 1968			
		11-10-67		5-1-68	10-5-68	12-10-68		21-2-69	25-6-69
		Soutirage				Soutirage			
		Avant	Après			Avant	Après		
Bonbonnes verre 25 l MC	Argon	126	135	290	246	262	285	215	265
	Azote	126	139	242	244	262	276	207	245
	Anhydride carbonique	126	162	262	238	262	282	232	
	Air	126	257	318	277	262	385	265	290
Bonbonnes verre 25 l Témoin	Argon					280	296	267	290

F. — *Dégustation*

L'ensemble des dégustations effectuées au cours des 5 premières années d'expérimentation a fait apparaître des différences importantes entre les vins élaborés par MC et les vins témoins :

— d'une part, le bouquet des vins du premier type a été trouvé plus intense et plus complexe que celui des Témoins. Les dégustateurs ont estimé, en outre, que la courte MC subie par la vendange avait été suffisante pour exalter les arômes typiques du cépage ;

— d'autre part, l'acidité des vins de MC a été jugée faible et la coloration de ces vins s'est révélée plus prononcée que celle des Témoins.

Le verdict des dégustateurs peut se résumer ainsi :

— selon l'attrait personnel du dégustateur pour les caractéristiques organoleptiques du cépage, phénomène particulièrement sensible pour le *Carignan*, les vins de MC ont été préférés ou non aux vins témoins sur le plan aromatique ;

— la coloration jaune des vins de MC est restée à un niveau acceptable pour les jurés ;

— dans tous les cas, les vins issus d'un mélange à volume égal de MC et de Témoin ont été préférés aux vins ayant servi à les élaborer : la fraction témoin a apporté l'acidité souhaitable et la fraction MC a donné sa richesse organoleptique ;

— enfin, il n'apparaît pas de différences significatives entre les vins conservés sous azote, argon ou gaz carbonique alors que les vins « aérés » sont jugés nettement

inférieurs aux précédents. Ainsi, l'influence souvent néfaste d'une aération des vins semble bien mise en évidence dans cet essai.

La faible acidité des échantillons MC est un défaut grave pour des vins blancs. C'est pourquoi nous avons cherché à relever cette acidité soit en bloquant la fermentation malolactique (1969) soit en tartriquant la vendange (1970). Soulignons que la fermentation intracellulaire a été particulièrement favorisée au cours de cette dernière expérimentation : température proche de sa température optimale (travaux en cours), anaérobiose rapide et totale durant les 48 heures par apport continu de CO_2, compensant l'absorption de ce gaz par la vendange (CHAMBROY, FERRY, FLANZY, 1970).

En 1969, les 13 membres du jury de dégustation ont été invités à classer les 4 vins présentés, les uns par rapport aux autres, sur la base de chacun des critères suivants : couleur, bouquet, acidité, saveur, préférence (attrait général). Un certain nombre de points ont été attribués à un rang donné : 4 points au vin classé en tête,

TABLEAU 8

Dégustation 1969

Type de vinification	SO_2 (mg/litre)	Couleur	Bouquet	Acidité	Saveur	Préférence générale
Témoin SO_2	50	32	34	44	38	34
Témoin	Traces	36	28	36	32	29
MC SO_2	58	15	14	19	21	14
MC	15	45	40	43	45	45

TABLEAU 9

Dégustation 1970

Type de vinification	Témoin ac. tartrique	Témoin	MC ac. tartrique	MC
Préférence générale	12	6	15	10

3 points au second, 2 points au troisième, 1 point au dernier. Les sommes des points obtenus pour chaque critère relatif à un vin, à partir des classements de tous les dégustateurs, sont rapportées dans le tableau 8.

Une oxydation accidentelle inexpliquée en cours de conservation s'est produite dans l'échantillon MC sulfité et explique, en majeure partie, les mauvaises appréciations portées sur ce vin.

Le lot MC non sulfité est classé en tête pour les critères couleur, bouquet, saveur, préférence. La phase MC de 48 heures a permis dans ce cas un gain important dans les qualités organoleptiques du vin.

La dégustation des essais 1970 (4 dégustateurs) confirme l'action bénéfique de la fermentation intracellulaire en classant les vins de MC devant les Témoins correspondants (tabl. 9).

Il est intéressant de noter, néanmoins, que le Témoin tartriqué est préféré au MC normal ; un tel jugement souligne l'importance du facteur acidité dans la dégustation des vins blancs.

IV. — CONCLUSIONS

Une macération carbonique de 48 heures semble suffisante pour accroître de façon sensible le bouquet et la saveur des vins blancs. Nos résultats rejoignent ceux des essais effectués en Anjou (PUISSANT, 1969) et à Châteauneuf-du-Pape (LANÇON, 1970), qui mettent en évidence les améliorations gustatives des vins par une courte macération carbonique.

Afin de favoriser cette MC, il est souhaitable de réaliser rapidement et de façon continue l'anaérobiose par le CO_2 tout en maintenant le raisin à une température relativement élevée (30-35°C).

Cependant, l'extraction de la matière colorante augmentant avec la température de macération (BOURZEIX, 1971), il convient de choisir en fonction du cépage une température qui, en permettant d'obtenir une coloration acceptable du vin, assure à ce dernier une exaltation nette de son arôme. De même, il peut être utile d'éviter le contact moût de goutte-vendange.

La fermentation par les microorganismes dans la deuxième phase de la vinification doit se réaliser en revanche à température basse (15-20°C).

Selon la région vinicole et les conditions climatiques annuelles, cette technique peut être utilisée telle quelle ou être complétée par certaines pratiques tendant à augmenter l'acidité des vins : tartricage, vinification précoce d'une fraction de la récolte puis assemblage avec les vins issus de raisins mûrs et biologiquement stabilisés, coupage de vins de MC et de vins élaborés par des techniques habituelles avec blocage de la fermentation malolactique par une sulfitation suffisante.

Par ailleurs, la fermentation intracellulaire augmentant les caractères *sui generis* des cépages, il importe de sélectionner pour ce type de vinification des variétés dont les qualités organoleptiques ne sont pas sujettes à controverses.

Enfin, le pressurage sous CO_2 suivi de soutirages et d'une conservation sous gaz inertes sont bénéfiques pour la bonne qualité des vins blancs.

Reçu pour publication en juillet 1971.

SUMMARY

VINIFICATION BY CARBONIC MACERATION
VI. — ELABORATION OF DRY WHITE WINES

Assays of vinification by carbonic maceration were made with the view to obtain white wines with aroma and sufficiently acid. Based on four vine-plants, 48 hours of carbonic maceration proves sufficient, if CO_2 anaerobiosis is rapid and if the temperature is adapted to the vine-plant avoiding contact between must and vintage. Tartarication may possibly lead to positive results. During racking off, contact with the air must be avoided.

RESUMEN

METODO DE VINIFICATION POR MACERACION CARBONICA
VI. — ELABORACION DE LOS VINOS BLANCOS SECOS

Se ha procedido a ensayos de vinificación por maceración carbónica con objeto de obtener vinos blancos aromáticos y suficientemente ácidos. Tomando como base cuatro variedades de vid, se ha puesto de manifiesto que una maceración carbónica de 48 horas es suficiente, con la condición de realizar rápidamente la anaerobiosis por el CO_2 y operar a una temperatura adaptada a la variedad de vid, evitando el contacto entre el moste de goteo y la vendimia. El tratamiento tartárico puede conducir eventualmente a la obtención de resultados positivos.

Deberá ser evitado todo contacto con el aire durante el transcurso de los trasiegos.

RIASSUNTO

METODO DI VINIFICAZIONE MEDIANTE MACERAZIONE CARBONICA
VI. — ELABORAZIONE DEI VINI BIANCHI SECCHI

Sono state eseguite delle prove di vinificazione mediante macerazione carbonica allo scopo di ottenere dei vini bianchi aromatici e sufficientemente acidi. Sulla base di quattro vitigni, si è trovato che una macerazione carbonica di 48 ore è sufficiente, a condizione di realizzare rapidamente l'anaerobiosi tramite il CO_2 e di operare a una temperatura adattata al vitigno, evitando il contatto tra il mosto di gocciolamento e la vendemmia.

Il trattamento tartarico puo' far ottenere eventualmente dei risultati positivi.

Durante i travasi evitare ogni contatto con l'aria.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Bénard P., Chambroy Y., Flanzy C., Jouret C., 1967. Méthode de vinification par macération carbonique. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 109-115 et 117-123.

André P., Flanzy C., 1967. Vinification par macération carbonique. *IIe Symposium international d'Œnologie*, Institut national de la Recherche agronomique, Paris.

Barre P., 1970. Rendement en levures des jus provenant des baies de raisin placées en atmosphère carbonique. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **55**, 1274-1277.

Bénard P., Jouret C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 85-102.

Bourzeix M., 1971. (Travaux en cours).

CHAMBROY Y., FERRY P., FLANZY C., 1970. Absorption de gaz carbonique par des baies de raisin. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **56**, 1470-1474.

CHARNAY P., 1958. Essais de vinification 1955-1957. *Vignes Vins*, (69), 2-8.

FLANZY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 89-107.

FLANZY C., BURET M., 1970. Fermentation intracellulaire et phénomène de diffusion en anaérobiose liquide. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **56**, 422-428.

JAULMES P., HAMELLE G., 1969. Conservation du vin en cuve en vidange sous gaz inerte. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, (684), 20-26.

JOURET C., MOUTOUNET M., 1970. Comparaison des substances volatiles émises au cours de la vinification de raisins foulés et non foulés. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 59-68.

LANÇON P., 1970. (Communication personnelle).

MOURGUES J., BÉNARD P., FLANZY C., JOURET C., 1967. Techniques de vinification en rouge et potentiel oxydo-réducteur. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 333-345.

PUISSANT A., 1969. (Communication personnelle).

SCHAEFFER A., 1968. Modalités de la vinification des vins blancs secs sous atmosphère de gaz carbonique. *Industr. aliment. agric.*, 1619-1625.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (3), 217-223.

ANALYSE DE QUELQUES CONSTITUANTS DÉRIVÉS DU CHÊNE DANS LES VIEILLES EAUX-DE-VIE D'ARMAGNAC

J. BRICOUT
avec la collaboration technique d'Yvette MOUAZÉ

Institut de Recherches appliquées aux Boissons,
87, rue de Paris, 93 - Montreuil

RÉSUMÉ

Par chromatographie sur gel de silice, on a mis en évidence dans les eaux-de-vie d'Armagnac vieillies en fûts de chêne plusieurs substances qui ont été identifiées par spectrographie de masse comme étant la vanilline, la syringealdéhyde, la coniféraldéhyde, la sinapaldéhyde, la scopolétine et l'hydroxyméthylfurfural. Ces produits apparaissent au cours du vieillissement de l'eau-de-vie par suite d'une dégradation oxydative de la lignine du chêne.

Mots clés : *eau-de-vie, vieillissement, phénol, Armagnac.*

INTRODUCTION

L'eau-de-vie d'Armagnac, au cours de son vieillissement en fûts de chêne, acquiert une belle couleur ambrée et son goût s'adoucit considérablement. Ce phénomène, qui résulte de l'action de l'alcool sur le bois, a été étudié par de nombreux auteurs dans le cas du whisky et de certaines eaux-de-vie de vin : SKURIKHIN (1968) a par exemple utilisé la chromatographie sur papier pour doser les aldéhydes aromatiques dans les eaux-de-vie de vin ; à l'aide de la même technique BALDWIN *et al.* (1967) ont en outre mis en évidence la présence de scopolétine dans le whisky ; GUYMON et CROWELL (1968) ont proposé une technique de séparation par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice pour doser approximativement les aldéhydes aromatiques de diverses eaux-de-vie. OTSUKA (1968) a enfin étudié, par chromatographie sur colonne de gel de silice, les phénols des whiskies vieillis et montré que la fraction la moins polaire contribuait beaucoup à leurs qualités organoleptiques.

On peut estimer qu'au cours du vieillissement de l'eau-de-vie d'Armagnac il doit se produire des phénomènes semblables à ceux observés dans le cas des autres eaux-de-vie, mais, à notre connaissance, ils n'ont pas été étudiés. Pour entreprendre cette étude, nous avons mis au point une méthode d'analyse par chromatographie sur gel de silice permettant de déceler et de doser quelques-uns des constituants provenant du chêne et pouvant être présents dans les eaux-de-vie vieillies. Afin de lever toute incertitude, nous avons identifié par spectroscopie UV et par spectrographie de masse les composés ainsi mis en évidence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation de l'échantillon

On évapore sous vide 250 ml d'eau-de-vie d'Armagnac à une température inférieure à 40°C. Le résidu est épuisé à trois reprises par 50 ml de benzène à 50°C. Les solutions benzéniques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre et concentrées sous vide jusqu'à un volume de 1-2 ml.

Chromatographie sur colonne de gel de silice

On imprègne 10 g de silice par 5 ml d'eau et on met en suspension dans 75 ml de benzène. On remplit avec cette suspension une colonne de verre de 10 mm de diamètre interne, pourvue à son extrémité inférieure d'une plaque en verre fritté. L'excès de benzène est éliminé et l'on dépose l'extrait benzénique au sommet de la colonne chromatographique. On élue par portions de 50 ml d'un mélange benzène-chloroforme contenant respectivement 0,5, 10,15, 20, 25, 30, 40 et 50 p. 100 de chloroforme et l'on recueille des fractions de 5 ml à l'aide d'un collecteur de fractions.

Chaque fraction est ensuite évaporée à sec sous vide, puis reprise par 5 ml d'éthanol à 96°GL. On détermine alors la densité optique de la solution éthanolique à 280 et 330 nm et l'on trace le chromatogramme en portant en abscisse le volume élué et en ordonnée la densité optique.

Chromatographie sur couche mince

On a utilisé des plaques de gel de silice G fluorescent de 0,25 mm d'épaisseur, activées par chauffage pendant 30 minutes à 110°C. Le développement était effectué avec deux systèmes de solvants sur une distance de 15 à 18 cm.

Solvant 1 : Éther de pétrole, alcool isoamylique, acide formique (100;30;0,25).
Solvant 2 : Benzène, dioxanne, acide acétique (90;25;4).

Les plaques étaient séchées et la détection se faisait en les examinant sous une lampe UV à 254 et 350 nm, et par pulvérisation d'une solution de 0,5 g de benzidine dans 20 ml d'acide acétique cristallisable et 20 ml d'éthanol à 96°GL ; les colorations se développaient par chauffage à 100°C pendant 15 minutes.

Pour réaliser la chromatographie préparative sur couche mince, on a utilisé de la silice G préalablement lavée pendant 8 heures par du chlorure de méthylène dans un Soxhlet. Cette silice a été étalée sur des plaques de verre en couche de 0,5 mm d'épaisseur.

Spectroscopie ultraviolette

On a utilisé un spectrophotomètre Beckman DU II ; les spectres complets ont été tracés point par point.

Spectrographie de masse

Les spectres sont déterminés sur un spectrographe Varian-Mat type CH 5. Quelques dizaines de µl d'une solution du produit dans le chlorure de méthylène sont placés dans un creuset en or. Après évaporation du solvant, on introduit le creuset par l'intermédiaire d'un sas étanche directement dans la source d'ions du spectrographe de masse. Les spectres sont enregistrés à un pouvoir de résolution de 1 000 et avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 exprime les résultats obtenus par fractionnement sur colonne de gel de silice de l'extrait benzénique d'une eau-de-vie d'Armagnac de 1954. Toutes les

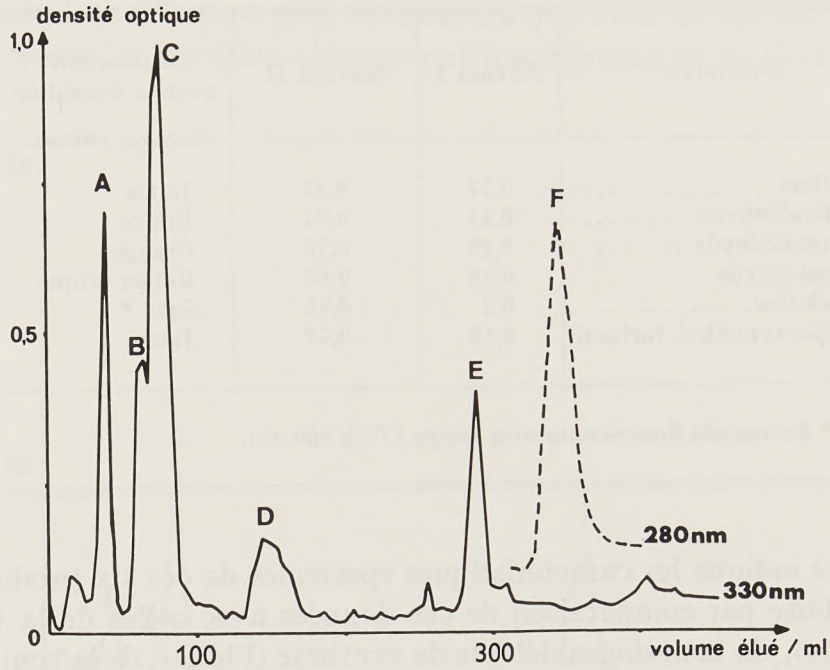
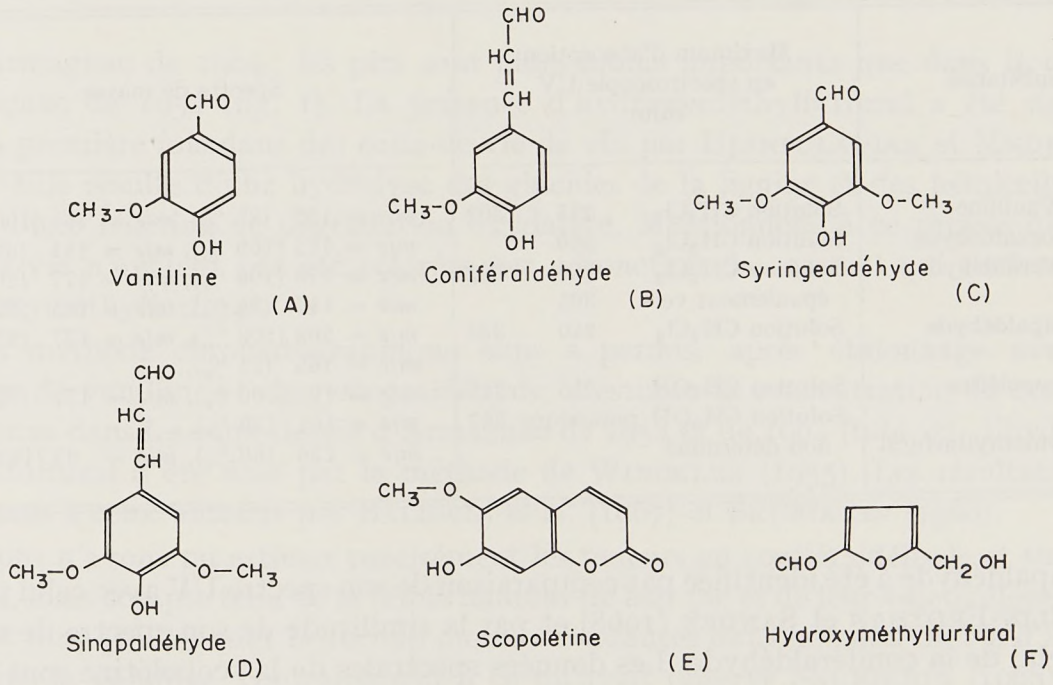


FIG. 1. — *Résultats fournis par fractionnement sur colonne de gel de silice de l'extrait benzénique d'une eau-de-vie d'Armagnac de 1954*

substances ont été mises en évidence par UV à 330 nm, à l'exception de la dernière qui a été décelée seulement à 280 nm ; elles ont été identifiées comme étant :



Le tableau 1 mentionne les valeurs de Rf de ces produits après chromatographie sur plaque de gel de silice G avec les deux systèmes de solvants de développement utilisés.

TABLEAU 1

Valeurs de Rf des composés étudiés après chromatographie sur couche mince de gel de silice

Substance	Solvant I	Solvant II	Coloration avec la benzidine
Vanilline	0,57	0,84	Jaune
Coniféraldéhyde	0,41	0,71	Rouge
Syringéaldéhyde	0,25	0,70	Orange
Sinapaldéhyde	0,16	0,63	Rouge brique
Scopolétine	0,2	0,46	Sans *
5-Hydroxyméthyl furfural	0,15	0,47	Jaune

* Fortement fluorescente sous lampe UV à 350 nm.

Le tableau 2 indique les caractéristiques spectrales de ces six produits. L'identification a été faite par comparaison de ces données avec celles de la vanilline de synthèse (Prolabo), de la syringealdéhyde de synthèse (Fluka), de la coniféraldéhyde synthétisée par condensation de l'acétaldéhyde avec la vanilline en milieu alcalin.

TABLEAU 2

Caractéristiques spectrales des composés étudiés

Substance	Maximum d'absorption en spectroscopie UV (nm)			Spectre de masse
Vanilline	Solution CH_2Cl_2	275	302	m/e = 152 (85 %), m/e = 151 (100 %)
Syringealdéhyde	Solution CH_2Cl_2	300		m/e = 182 (100 %), m/e = 181 (62 %)
Coniféraldéhyde	Solution CH_2Cl_2	240	332	m/e = 178 (100 %), m/e = 177 (20 %)
	épaulement vers	305		m/e = 147 (34 %), m/e = 135 (32 %)
Sinapaldéhyde	Solution CH_2Cl_2	240	335	m/e = 208 (100 %), m/e = 177 (33 %)
				m/e = 165 (51 %),
Scopolétine	Solution CH_3OH	245	345	m/e = 192 (100 %), m/e = 177 (72 %)
	Solution CH_3OH potassique		387	m/e = 164 (39 %),
Hydroxyméthylfurfural	non déterminé			m/e = 126 (60 %), m/e = 97 (100 %)

La sinapaldéhyde a été identifiée par comparaison de son spectre UV avec celui publié par AULIN-ERDTMAN et SANDEN (1968) et par la similitude de son spectre de masse avec celui de la coniféraldéhyde. Les données spectrales de la scopolétine sont iden-

tiques à celles publiées par THIER *et al.* (1968). Dans le cas de l'hydroxyméthylfurfural, qui est très difficile à purifier, on a eu recours à une réaction caractéristique selon WINCKLER (1955) : après réaction avec la *p*-toluidine on observe une coloration rouge avec l'acide barbiturique.

Nous avons vérifié que les aldéhydes aromatiques se formaient lentement au cours du vieillissement, par dégradation oxydative de la lignine du chêne des fûts. En effet, ces substances n'ont pas été décelées dans une eau-de-vie fraîchement distillée et elles étaient d'autant plus abondantes que l'eau-de-vie était plus âgée. La figure 2 représente les résultats obtenus par fractionnement de l'extrait benzénique

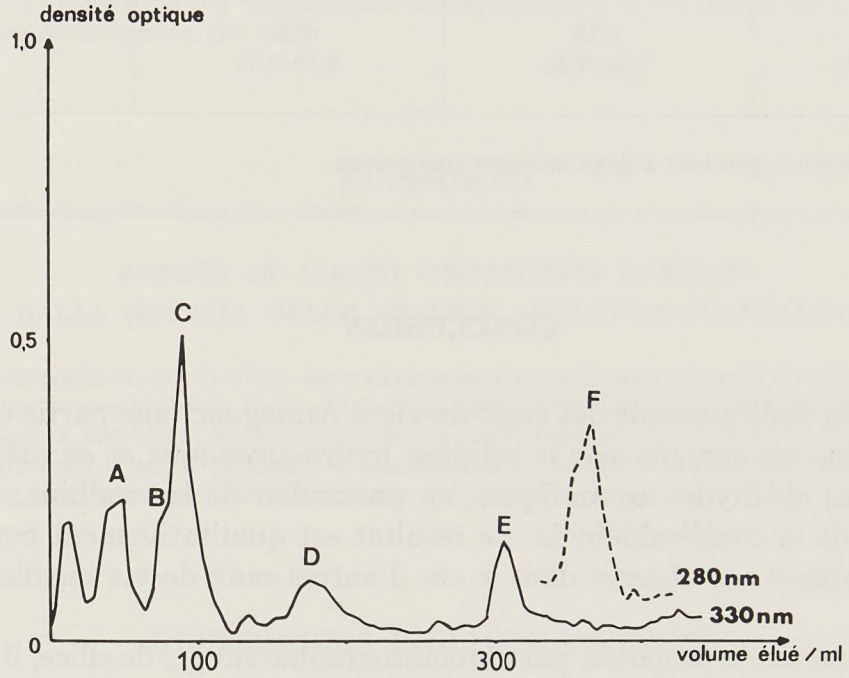


FIG. 2. — *Résultats fournis par fractionnement sur colonne de gel de silice de l'extrait benzénique d'une eau-de-vie d'Armagnac de 1964*

d'un Armagnac de 1964 ; les pics sont alors moins importants que dans le cas de l'Armagnac de 1954 (fig. 1). La présence d'hydroxyméthylfurfural a été signalée pour la première fois dans des eaux-de-vie de vin par DJANPOLADIAN et MNDJOYAN (1969). Elle résulte d'une hydrolyse des glucides de la lignine et des hémicelluloses suivie d'une réaction de dégradation oxydative. Mentionnons à ce propos que ces eaux-de-vie n'avaient pas été colorées par adjonction de caramel qui renferme de l'hydroxyméthylfurfural.

La méthode chromatographique nous a permis, après étalonnage avec un mélange de vanilline et de syringealdéhyde, d'estimer la concentration de ces deux substances dans les eaux-de-vie d'Armagnac de 1954 et de 1964 (tabl. 3) ; l'hydroxyméthylfurfural a été dosé par la méthode de WINCKLER (1955). Les résultats sont conformes à ceux obtenus par BALDWIN *et al.* (1967) et SKURIKHIN (1968).

Nous n'avons pu estimer précisément les teneurs en coniféraldéhyde et sinapaldéhyde, mais compte tenu de la faible hauteur de leur pic et de leur valeur élevée de ε on peut dire qu'elles sont beaucoup moins abondantes dans les eaux-de-vie d'Armagnac que la vanilline, contrairement à ce qu'avait observé SKURIKHIN (1968) dans

l'eau-de-vie de vin et BALDWIN *et al.* (1967) dans le whisky. Ces différences peuvent être dues à l'origine différente du chêne des fûts ainsi qu'à son prétraitement.

TABLEAU 3

Teneurs en vanilline, syringealdéhyde et hydroxyméthylfurfural de deux eaux-de-vie d'Armagnac

Échantillon	Vanilline (g par hl d'alcool pur)	Syringealdéhyde (g par hl d'alcool pur)	Hydroxyméthylfurfural (g par hl d'alcool pur)
Eau-de-vie 1964.....	0,13	0,26	0,8
Eau-de-vie 1954 (1).....	0,34-0,38	0,49-0,55	2,9

(1) Ces valeurs correspondent à deux analyses successives.

CONCLUSION

Au cours du vieillissement des eaux-de-vie d'Armagnac, une partie de la lignine des fûts en chêne est extraite par la solution hydro-alcoolique et oxydée lentement pour donner des aldéhydes aromatiques, en particulier de la vanilline, de la syringealdéhyde et de la coniféraldéhyde. Ce résultat est qualitativement conforme à ce que certains auteurs ont observé dans le cas d'autres eaux-de-vie vieillies en fûts de chêne.

Grâce à la méthode proposée, par chromatographie sur gel de silice, il est possible de suivre l'évolution des réactions de vieillissement et d'apprécier l'influence de divers paramètres sur ces phénomènes.

Reçu pour publication en juillet 1971.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. P. DUBOIS (Station de Technologie des Produits végétaux, I. N. R. A., Dijon) d'avoir bien voulu établir les spectres de masse avec leur appareillage.

SUMMARY

ANALYSIS OF SOME COMPOUNDS ARISING FROM THE OAK WOOD IN OLD BRANDIES OF ARMAGNAC

By chromatography on a silicic acid column, it is possible to estimate in aged brandies of Armagnac the concentration of the following compounds : vanillin, syringealdehyde, coniferaldehyde, sinapaldehyde, scopoletin, hydroxymethylfurfural, which were identified by mass spectrometry. These substances are produced by ethanolysis and oxydation of the oak lignin of the barrels.

RESUMEN

ANALISIS DE ALGUNOS COMPONENTES DERIVADOS DEL ROBLE EN LOS AGUARDIENTES AÑEJOS DE ARMAGNAC

Por cromatografia sobre gel de sílice, se ha podido poner de manifiesto en los aguardientes de Armagnac añejados en barricas de roble, la presencia de diversas substancias que han sido identificadas por espectrografía, de masa y que son la vanilina, la siringaldeida, la coniferaldeida, la sinalpaldeida, la escopoletina y el hidroximetilfurfural. Estos productos aparecen durante el transcurco del añejamiento del aguardiente como consecuencia de una degradación oxidativa de la lignina del roble.

RIASSUNTO

ANALISI DI ALCUNI COSTITUENTI DERIVATI DALLA QUERCIA NELLE VECCHIE ACQUAVITE D'ARMAGNAC

Per cromatografia su gel di silice, sono state messe in evidenza parecchie sostanze nelle acquevite d'Armagnac invecchiate in fusti di quercia. Esse sono state identificate per spettrografia di massa e sono : la vanillina, la siringaldeide, la coniferaldeide, la sinapaldeide, la scopoletina e l'idrossimetilfurfurolo. Questi prodotti si manifestano durante l'invecchiamento dell'acquavite in seguito a una degradazione ossidativa della lignina della quercia.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aulin-Erdtman G., Sanden R., 1968. Spectrographic contributions to lignin chemistry. *Acta chem. scand.*, **22**, 1187-1209.

Baldwin S., Black R. A., Andreasen A. A., Adams L. A., 1967. Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates. *J. agric. Food Chem.*, **15**, 381-385.

Djanpoladian L. M., Mndjoyan E. L., 1969. Modification des glucides de la lignine du chêne dans un milieu éthanolique. *Vinod. Vinogr.*, **29** (7), 13-16.

Guymon J. F., Crowell E. A., 1968. Separations of vanillin, syringealdehyde and other aromatic compounds in the extracts of french and american oak woods by brandy and aqueous alcohol solutions. *Qual. Plant. Materiae veg.*, **16**, 302-333.

Otsuka K., 1968. Étude sur le mécanisme du vieillissement des eaux-de-vie ; in : *Fermentations et vinifications*, 2e Symposium international d'Œnologie, Bordeaux-Cognac, 1967, tome 2, 619-625. Institut national de la Recherche agronomique, Paris.

Thier H. P., Bricout J., Viani R., Reymond D., Egli R. H., 1968. Scopoletin, ein Bestandteil des Rohkaffees. *Z. Lebensmittel. Unters. u. Forsch.*, **137** (1), 1-4.

Skurikhin I. N., 1968. Sur les substances responsables de l'absorption ultraviolette des alcools de Cognac *Izv. Vuz. ser Piscev. Tekhnol.* (2), 88-93.

Winkler O., 1955. Beitrag zur Nachweiss und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honig und Kunsthonig. *Z. Lebensmittel. Unters. u. Forsch.*, **102** (3), 161.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (3), 225-240.

INTERDÉPENDANCE ENTRE LE RENDEMENT, LA MATURATION DES RAISINS ET LA QUALITÉ DES VINS

C. LOINGER et B. SAFRAN

Institut israélien du Vin, P.O.B. 529, Rehovot (Israël)
Ministère de l'Agriculture, Israël

RÉSUMÉ

Des études ont été faites pour établir une relation entre le rendement, la maturation des raisins et la qualité des vins, compte tenu des principaux facteurs pouvant influencer le rapport entre la surface foliaire et la charge du cep, comme le mode de conduite (gobelet *vs* vigne palissée), le cru, les soins de culture, l'irrigation et le rendement excessif.

Les résultats sont basés sur les travaux des années 1967 et 1968 et sur l'étude de quatre cépages : *Alicante Grenache, Carignan, Sémillon* et *Sauvignon blanc.*

Contrairement à ce qu'on admet en général, il a été trouvé que les vignes à bas rendements ne donnaient pas toujours les meilleurs vins. En général, les vins de qualité moyenne ainsi que la plupart des bons vins proviennent des vignes de rendements moyens ou bons (4-8 kg/cep ; 8 000 à 16 000 kg/ha).

Ces résultats sont principalement attribués aux facteurs qui provoquent un rapport favorable entre la surface foliaire et la charge du cep. Pourtant il a été constaté que des rendements excessifs ont des effets défavorables sur la qualité des vins et notamment sur la couleur des vins rouges.

La qualité des vins blancs a été défavorablement affectée dans le cas de surmaturation et de maturation déséquilibrée. En plus, la perte de poids des raisins (5 à 20 p. 100) a été insuffisamment compensée par l'augmentation de leur teneur en sucre.

Dans cette étude, il s'agit de qualité de vins obtenus dans les conditions climatiques des régions chaudes comme Israël.

Mots clés : *raisin, vin, rendement, maturation, qualité.*

I. — INTRODUCTION

Traditionnellement il est admis que qualité et quantité s'opposent et qu'il faut limiter le rendement des cépages pour obtenir de grands vins (BRANAS, 1966, 1970).

Néanmoins, les travaux d'autres auteurs, publiés ces dernières années, montrent

qu'on ne peut pas généraliser catégoriquement sur ce sujet (GALLAY, 1966 ; CONSTANTINESCU, MARTIN et NEAGU, 1967 ; COSMOS, CALO et LIUNI, 1970 ; HERNANDEZ et COULON, 1970 ; KIEFER, 1970 ; NAZRALA et MARTINEZ PELAEZ, 1970).

Par cette communication, nous voulons également démontrer qu'il y a de nombreux cas où, malgré le rendement plus élevé, les vins étaient au moins égaux sinon meilleurs en qualité que ceux provenant de vignes à plus bas rendement.

Bien entendu, quand nous parlons de vins de qualité, nous ne pensons pas à de grandes appellations, vins exceptionnels à tous les points de vue, mais aux qualités de vins pouvant être obtenues dans les conditions climatiques des régions chaudes où nous nous trouvons.

Depuis 1963, on étudie à l'Institut israélien du Vin la maturation des raisins de cuve et la qualité potentielle de leurs vins (LOINGER, 1965, 1967, 1969, et en voie de publication).

Cette étude porte en particulier :

— sur les cépages de cuve en production ou en voie d'introduction ;
— sur toutes les régions viticoles du pays (cru ou complexe sol-microclimat) ;
— sur le rendement excessif ;
— sur les divers modes de conduite et autres facteurs.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Les principales étapes ont été les suivantes :

1. — *Étude de la maturation* qui comprend :

— augmentation du poids des baies ;
— accumulation du sucre dans les baies ;
— évolution des acides organiques ;
— évolution de la couleur ;
— établissement de l'indice de maturité.

Cette étude a été faite, à partir de la véraison jusqu'à la surmaturation, de façon continue (échantillonnage une fois par semaine, étude de 1 000 grains, selon CASSIGNARD, 1962).

L'échantillonnage pour les vinifications s'est fait sur 20 ceps, marqués au hasard entre 1 000 ceps, selon la méthode préconisée par OUGH (1965) et grâce à l'étude de la maturation citée plus haut ; il a été possible de faire deux à trois vinifications pour chaque cépage dans chaque région, englobant ainsi toute la période de la maturité optimale, compte tenu du microclimat et de l'année.

2. — *Élaboration des vins*

Les vins furent élaborés avec la même technique (SO_2, levures sélectionnées, etc.) selon les méthodes préconisées pour ce type de recherche par l'Institut d'Œnologie de Bordeaux (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1952, 1960) et l'Université de Davis, Californie (AMERINE, BERG et CRUESS, 1967).

On a choisi pour cette étude des vins n'ayant pas subi de fermentation malolactique, car l'influence favorable ou défavorable de cette dernière sur la qualité des vins des régions chaudes n'est pas encore établie et cela spécialement pour les vins rouges (ROSENTHAL et LOINGER, 1969).

Les vins furent également analysés systématiquement pour connaître leur exacte composition chimique.

3. — *Dégustation des vins*

Sans indications sur le cépage, la région ou le rendement (selon les méthodes de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux, PEYNAUD, 1965) par une équipe permanente de 8 à 10 dégustateurs provenant des principales caves, des services gouvernementaux concernés et de l'Institut israélien du Vin.

Étant donné la technique de vinification mentionnée, les vins de l'Institut reçoivent pratiquement toujours quatre points sur vingt pour la limpidité et pour la couleur (le maximum possible) et en conséquence les principaux facteurs pour juger nos vins sont le goût (dix points au maximum) et l'arôme (six points au maximum). Dans ces conditions, il est permis d'admettre que les vins se différencient par la dégustation à partir d'un point d'écart au minimum.

Grâce à toutes ces précautions, nous pouvons dire que toutes les différences observées, tant du point de vue chimique que du point de vue gustatif, proviennent exclusivement des raisins et en aucun cas de la technologie vinicole.

Il est donc ainsi possible de mettre en relation le cépage, la maturation des raisins et la qualité des vins.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. — *Rendement et qualité des vins*

Les faits dont nous allons parler et qui sont fondés sur les différences de rendement ont été établis sur de nombreux cépages (une vingtaine au moins) et sur près d'un millier de vinifications (en l'espace de 5 ans), mais nous nous limiterons dans cette communication aux travaux des années 1967 et 1968 et à quatre cépages importants : *Carignan, Alicante Grenache, Sémillon* et *Sauvignon blanc.*

Comme paramètres de comparaison, nous avons choisi des vins provenant de cépages en gobelet et dans la mesure du possible avec un même degré alcoolique.

Sur les tableaux que nous allons examiner, nous donnons aussi quelques exemples où les meilleurs vins provenaient de cépages à bas rendements.

On trouvera sur tous les tableaux, l'année, la région, le degré alcoolique, l'acidité fixe (en ac. tart.), le rendement en kg/cep (2 000 ceps/ha), la note de dégustation (0-20) et le Code (pour simplifier l'interprétation des tableaux, les différents vins sont désignés par des lettres).

Les régions citées sont chiffrées de la manière suivante : région I : Zicron Yacob (plaine Nord-Samarie) ; région II : Neguev ; région III : Guedera (plaine Sud) ; région IV : Saidun (plaine centrale) ; région V : Hulda (plaine centrale) ; région VI : Adulam (collines de Jérusalem) ; région VII : Ramat Naftali (montagnes de Galilée) ; région VIII : Beth-Shemesh (collines de Jérusalem).

Carignan (tabl. 1). Le vin A à plus haut rendement, comparé à B et C, reçoit des notes égales ou supérieures. Le vin E reçoit de meilleures notes que D, mais les rendements diffèrent dans le rapport de un à trois, cas extrême qui ne se répétera pas toujours comme nous verrons plus loin.

Les vins F et G, H et I ont respectivement les mêmes notes malgré les meilleurs rendements (150 p. 100 de différence dans le cas F et G). Les vins K et L, dont les rendements sont plus faibles que J, sont mieux notés que ce dernier, mais il faut remarquer que, dans ce cas, le rendement de J est quatre fois celui de K. Si nous comparons entre eux L et K, nous voyons que malgré la grande différence de rendement, les notes sont pratiquement les mêmes, ce qui oblige à considérer l'aspect économique du problème.

Alicante Grenache (tabl. 2). Le vin A comparé aux vins B et C donne des résultats opposés. Mêmes notes dans le premier cas malgré un rendement double, et meilleure

note dans le deuxième cas, pour le plus faible rendement. La comparaison de D à E et F donne des résultats similaires aux précédents, mais les différences sont moindres pour les vins D et F aussi bien pour les rendements que pour les notes.

TABLEAU I

Rendement et qualité des vins. Carignan

Année	Région	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1967	VIII	13,4	6,90	7,9	14,90	A
	IV	13,2	6,23	4,8	14,60	B
	III	13,0	5,18	6,6	14,00	C
	I	11,3	4,84	15,0	11,10	D
	IV	11,8	6,73	4,8	14,40	E
1968	VIII	11,5	5,54	10,7	14,00	F
	VI	12,1	6,83	4,0	13,81	G
	I	10,1	4,98	12,2	12,60	H
	VII	10,7	7,25	8,4	12,75	I
	I	10,3	4,75	12,2	12,10	J
	III	10,3	6,63	3,0	14,50	K
	VII	10,7	6,00	8,4	14,25	L

TABLEAU 2

Rendement et qualité des vins. Alicante Grenache

Année	Région	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1967	VI	12,1	6,05	8,3	11,80	A
	III	12,3	6,90	3,8	11,40	B
	III	12,3	5,08	4,8	13,80	C
1968	VI	11,9	4,95	8,2	12,80	D
	IV	12,2	5,95	4,7	12,50	E
	III	12,3	5,73	6,0	13,70	F

Sauvignon Blanc (tabl. 3). Ce cépage, qui donne aussi les meilleurs vins en Israël, a la particularité de ne pas souffrir des bons rendements. L'examen de tous les vins montre que l'on obtient de bons vins quel que soit le rendement. Les vins A, B, C, D, E reçoivent tous de bonnes notes, et c'est le vin F, à plus faible rendement, qui est le plus mal noté (2,8 kg ; 12,28) ; comparé à C (12 kg/cep ou 24 tonnes/ha ; 15,00 comme note), ce cas extrême oblige à réfléchir.

Sémillon (tabl. 4). Le vin B à faible rendement est comparé à A et C à plus hauts rendements, et c'est le vin A qui reçoit la meilleure note, avec un rendement intermé-

diaire, mais tout de même le double de B. Dans le cas D et E, c'est le vin D à plus haut rendement qui reçoit la meilleure note. Le vin F, comparé à G et H, obtient les mêmes notes malgré un plus haut rendement.

TABLEAU 3

Rendement et qualité des vins. Sauvignon blanc

Année	Région	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1967	I	11,90	5,43	9,4	14,31	A
	III	12,30	6,70	4,7	15,30	B
1968	I	11,70	5,74	12,0	15,00	C
	II	11,70	5,48	5,6	14,28	D
	VIII	11,90	5,00	4,3	14,50	E
	III	11,60	5,95	2,8	12,28	F

TABLEAU 4

Rendement et qualité des vins. Sémillon

Année	Région	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1967	I	9,8	4,61	8,9	13,60	A
	I	9,8	4,45	4,5	12,20	B
	I	9,3	3,90	10,8	11,10	C
1968	VIII	11,3	4,33	7,0	14,40	D
	III	11,6	5,70	4,4	13,50	E
	VIII	12,2	3,68	7,0	13,70	F
	III	12,0	6,41	4,4	13,40	G
	VI	12,0	4,25	4,0	13,90	H

Ces exemples, qui prouvent qu'il y a de nombreux cas où un plus haut rendement n'empêche pas une bonne qualité de vins, pourraient s'expliquer par un rapport plus favorable entre la surface foliaire et la charge du cep.

2. — *Facteurs influençant le rapport entre la surface foliaire et la charge du cep*

Les facteurs qui provoquent un rapport plus favorable entre la surface foliaire et la charge du cep sont nombreux ; en conséquence nous nous limiterons dans cette communication à l'étude de quelques-uns seulement, et à leur influence respective sur la maturation, le rendement et la qualité des vins.

a) *Le mode de conduite.*

Nous pensons que le mode de conduite est un des facteurs qui influence le plus le rapport favorable cité plus haut, comme il a été démontré dans de nombreux travaux présentés par d'autres auteurs, en Israël et ailleurs (COSMOS, CALO et LIUNI, 1970 ; KIEFER, 1970 ; NAZRALA et MARTINEZ PELAEZ, 1970 ; SAFRAN et HOCHBERG, 1969 ; STOEV, 1967).

Voyons quelques exemples.

Sauvignon Blanc.

Les vins A et B (tabl. 5), vignes palissées (1 et 3 fils respectivement), et le vin C, vigne en gobelet, proviennent d'un même vignoble et la vendange a été faite le même jour. Malgré un plus haut rendement des vignes palissées, les notes des vins sont identiques. C'est un excellent exemple, car le degré de maturation est semblable et il est permis d'admettre que c'est le développement foliaire des vignes palissées qui a donné le plus haut rendement, sans affecter la maturation des raisins ni abaisser la qualité des vins.

TABLEAU 5

Mode de conduite. Son influence sur la maturation, le rendement et la qualité des vins
Sauvignon blanc et Sémillon.

Année et cépage	Région	Mode de conduite	Date de vendange	Alcool p. 100	Ac. fixe g/l ac. (tartrique)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1968 *Sauvignon* blanc	II	v. palissée	31-7	11,2	6,53	7,8	14,00	A
	II	v. palissée	31-7	11,7	5,28	7,8	13,92	B
	II	gobelet	31-7	11,7	5,48	5,6	14,28	C
1967 *Sémillon*	VI	v. palissée	10-9	10,1	5,05	6,7	16,10	D
	VI	gobelet	3-9	10,0	4,66	4,0	14,40	E
	III	gobelet	22-8	10,3	4,44	3,8	14,10	F
1968 *Sémillon*	VI	v. palissée	19-8	11,3	5,38	10,1	13,70	G
	VI	gobelet	12-8	12,0	4,25	4,0	13,90	H
	III	gobelet	1-8	11,6	5,70	4,4	13,50	I
	II	v. palissée	7-8	10,5	4,80	9,0	12,90	J
	II	gobelet	7-8	10,7	4,50	6,5	11,30	K
	I	gobelet	4-8	10,2	4,50	6,7	12,30	L

Sémillon.

Le vin D, vigne palissée, et E, vigne en gobelet (tabl. 5) proviennent d'un même vignoble et dans ce cas, le retard de maturation de la vigne palissée a été rattrapé en reculant la vendange d'une semaine. Le vin D, avec le meilleur rendement, reçoit une note très supérieure aux vins E et F (ce dernier d'un autre vignoble).

Les notes des vins G, H et I sont identiques, malgré le rendement supérieur (150 p. 100) du vin G, de vigne palissée. Les vins G et H proviennent du même vignoble, et l'équilibre sucre/acidité du vin G nous paraît supérieur au vin H.

Pour les vins J, K et L, la maturation est plus ou moins la même, et c'est le vin J de vigne palissée et du plus haut rendement qui reçoit la meilleure note ; les vins J et K proviennent du même vignoble

En résumé, il apparaît clairement sur le tableau 5 que les vins de vigne palissée sont égaux ou supérieurs aux vins de vigne en gobelet (pour un même vignoble) et cela malgré un rendement toujours nettement plus élevé.

Pour le cépage *Sémillon*, la comparaison entre vins de vigne palissée et vins de vigne en gobelet, de région différente mais de maturité voisine, donne le même résultat favorable aux vins de vigne palissée, ce qui confirme la prépondérance du facteur mode de conduite.

Grâce aux résultats cités pour le cépage *Sémillon* et vu le manque d'échantillons de vins des cépages *Alicante Grenache* et *Carignan* en provenance d'un même vignoble, nous nous sommes permis de comparer des vins de régions différentes, tout en recherchant un degré de maturation voisin.

Alicante Grenache.

Les trois vins A, B et C (tabl. 6) ont reçu les mêmes notes, et cela bien que le vin A, de vigne palissée, corresponde à un rendement plus élevé que les deux autres vins, vigne en gobelet. Cette différence de rendement est plus notable entre A et C (150 p. 100) et malgré cela la maturité est identique.

TABLEAU 6

Mode de conduite. Son influence sur la maturation, le rendement et la qualité des vins
Alicante Grenache et Carignan

Année et cépage	Région	Mode de conduite	Date de vendange	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1968	V	v. palissée	18-8	12,4	5,20	11,7	12,83	A
Alicante	VI	gobelet	19-8	11,9	4,95	8,2	12,83	B
Grenache	IV	gobelet	5-8	12,2	5,95	4,7	12,50	C
1968	V	v. palissée	27-8	11,3	6,50	13,5	12,73	D
Carignan	VII	gobelet	21-8	10,9	7,25	8,4	12,75	E

Carignan.

Le vin D, vigne palissée, à plus haut rendement, a reçu la même note que le vin E, vigne en gobelet, à plus faible rendement (tabl. 6). L'équilibre sucre/acidité est meilleur dans le cas du vin D, et nous voyons une fois de plus que la vigne palissée ne défavorise ni la maturation, ni la qualité des vins, tout en donnant un meilleur rendement. Nous attribuons ces résultats favorables principalement à une plus grande surface foliaire qui permet une bonne accumulation de sucres.

b) *Cru, irrigation, soins de culture.*

Ces facteurs influencent directement le développement végétatif du cep, et contribuent donc également à un rapport favorable surface foliaire/charge du cep.

Sauvignon Blanc (tabl. 7).

Les vins A, B et C, vignes en gobelet, ont reçu des notes très proches avec un léger avantage pour le vin A, qui a un rendement très supérieur aux deux autres vins (jusqu'au triple). Nous attribuons ces résultats aux conditions du cru, complexe sol-microclimat, et aux soins de culture.

TABLEAU 7

Cru, irrigation, soins de culture. Leur influence sur la maturation, le rendement et la qualité des vins
Sauvignon blanc, Sémillon, Carignan

Année et cépage	Région	Mode de conduite	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1968	I	gobelet	11,7	5,74	12,0	15,00	A
Sauvignon	II	gobelet	11,7	5,48	5,6	14,28	B
blanc	VIII	gobelet	12,0	5,00	4,3	14,50	C
1968	VI	v. palissée	11,1	5,38	10,1	13,70	D
Sémillon	II	v. palissée	10,5	5,30	5,4	11,25	E
1967	VIII	gobelet	13,4	6,90	7,9	14,90	F
Carignan	IV	gobelet	13,2	6,23	4,8	14,60	G
1968	VIII	gobelet	11,5	5,54	10,7	14,00	H
Carignan	VI	gobelet	12,1	6,83	4,0	13,80	I

En effet la terre de la région I (vin A) est argileuse et profonde, et le climat du type littoral, alors que la région II (vin B) a une terre de loess et son climat est désertique. La terre de la région VIII (vin C) est argileuse mais peu profonde, et son climat est intermédiaire.

En plus, il est connu que le propriétaire du vignoble de la région I est un des viticulteurs les plus qualifiés du pays, et il semble justifié d'attribuer aux soins de culture un meilleur développement des vignes, ce qui a contribué à un rapport favorable surface foliaire/charge du cep, à l'obtention d'un bon rendement et d'un excellent vin, comme c'est le cas du vin A (12 kg/cep ; 15,00 comme note).

Sémillon (tabl. 7).

Pour le cas D et E, vignes palissées, le vin D (double rendement) est mieux noté que le vin E. Nous attribuons ces résultats au cru, car il s'agit respectivement de terres argileuses et de loess comme dans le cas précédent.

Carignan (tabl. 7).

Les vins F et G, H et I, tous de vignes en gobelet, ont reçu des notes très proches, respectivement dans chaque groupe, et cela malgré les plus hauts rendements de F et de H.

Nous attribuons ces résultats à l'influence de l'irrigation, puisque les vignobles de la région VIII (vins F et H) ont reçu 3 000 m³ d'eau par ha (en été) contre 1 000

à 1 500 pour ceux des régions IV (vin G) et VI (vin I). Ces résultats sont comparables, bien qu'il s'agisse de régions différentes, car le climat de ces trois régions est très semblable, et les échantillons choisis proviennent respectivement de vignes d'un même mode de conduite, et de maturation très proche.

D'autres auteurs ont également étudié l'influence de l'irrigation sur le développement de la vigne et l'augmentation du rendement, et ils avaient déjà constaté que, dans certaines conditions climatiques, l'irrigation était favorable à la maturation des raisins sans affecter la qualité des vins (HOCHBERG, 1954 ; MAIMON, 1961 ; BRAVDO et GAIRON, 1963 ; GENTILINI, 1970).

Une augmentation de rendement due à l'irrigation provoque souvent des retards de maturation, retard rattrapé en quelques jours, comme cela a été déjà constaté par SPIEGEL-ROY et BRAVDO (1964), et comme nous l'avons nous même noté plus haut, lors de l'étude des divers modes de conduite.

c) *Rendement excessif.*

Après avoir montré par les exemples rapportés qu'un bon rendement peut être favorable à l'obtention de bons vins, nous montrerons maintenant que des rendements excessifs ont des effets défavorables sur la qualité des vins et cela spécialement pour les vins rouges.

Pour cette démonstration, nous avons choisi des vins de teneur en alcool voisine, ce facteur étant très important pour apprécier l'évolution de la couleur. Nous retrouverons sur le tableau suivant la mesure de la couleur, selon la formule de SUDRAUD (1958) : Intensité de la couleur = somme des densités optiques à 420 et 520 nm.

Alicante Grenache (tabl. 8).

Le vin A, vigne palissée, de plus haut rendement, a reçu une note inférieure aux vins B et C, gobelet. L'intensité de la couleur du vin C, le meilleur vin, est le double du vin A, le meilleur rendement (2,48 et 1,42).

TABLEAU 8

Rendement excessif. Son influence sur la qualité des vins rouges
Alicante Grenache et Carignan

Année et cépage	Région	Mode de conduite	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Couleur (420+520 nm)	Rendement (kg/cep)	Note de dégustation (0-20)	Code
1968	V	v. palissée	12,4	5,20	1,42	11,7	12,80	A
Alicante	III	gobelet	12,4	5,73	1,94	6,0	13,70	B
Grenache	III	gobelet	12,9	6,36	2,48	5,4	13,90	C
1967	I	gobelet	11,4	4,84	3,20	15,0	11,10	D
Carignan	III	gobelet	11,6	5,79	4,60	6,6	13,70	E
	IV	gobelet	11,8	6,73	5,85	4,8	14,40	F
1968	V	v. palissée	11,3	6,48	2,95	13,5	12,60	G
Carignan	VIII	gobelet	11,5	5,54	4,05	10,7	14,00	H
	IV	gobelet	11,0	7,13	4,65	4,7	14,60	I
	III	gobelet	11,4	5,53	6,40	3,0	15,50	J

Carignan (tabl. 8).

Mêmes résultats pour ce cépage, bien que la couleur soit plus intense en général (caractère variétal). Les vins D et G à hauts rendements sont respectivement inférieurs en qualité aux vins E, F et H, I, J, et les meilleurs vins de chaque groupe sont F et J, aux plus faibles rendements. La couleur augmente au fur et à mesure que diminue le rendement (de 3,20 à 5,85 dans le groupe D, E et F et de 2,95 à 6,40 dans le groupe G, H, I et J).

Nous voyons ainsi que pour ces deux cépages il y a interdépendance entre le rendement, la qualité des vins et l'intensité de la couleur ; mais, même dans ces exemples, les vins à rendement moyen ont de bonnes notes et des couleurs acceptables (vins B, E, H, I) et c'est seulement dans les cas de rendements excessifs (vins A, D, G atteignant 25-30 t/ha) que les notes et la couleur baissent notablement.

D'ailleurs l'influence négative de l'excès de rendement sur la qualité du vin a déjà été établie par GALLAY en 1966, ainsi que les relations avec le mode de conduite et la taille.

3. — *Influence de la maturation sur la qualité des vins*

L'évolution plus ou moins favorable de la maturation est finalement un des facteurs fondamentaux de la qualité des vins.

Par quelques exemples, nous voulons montrer en terminant que dans les cas de surmaturation ou de début de surmaturation et de maturation déséquilibrée (rapport sucre/acide modifié ou déséquilibre des acides organiques), la qualité des vins est défavorablement affectée.

TABLEAU 9

Évolution de la maturation. Son influence sur la qualité des vins

Sauvignon blanc

Année	Région	Mode de conduite	Date de vendange	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Note de dégustation (0-20)	Code
1967	II	gobelet	9-8	11,3	7,45	15,60	A
			16-8	12,6	6,19	13,80	B
1968	II	gobelet	31-7	11,7	5,48	14,30	C
			7-8	12,4	5,75	12,90	D
	II	v. palissée	31-7	11,2	6,53	14,00	E
			7-8	11,6	4,25	12,60	F
	II	v. palissée	31-7	11,7	5,28	13,90	G
			7-8	13,3	5,05	12,40	H
	III	gobelet	30-7	11,6	5,95	12,30	I
			6-8	13,2	5,25	15,00	J

Nous avons observé des pertes de poids de 5 à 20 p. 100 à partir de la maturité physiologique, pertes de poids qui à notre avis sont insuffisamment compensées par l'augmentation des sucres, ce qui pose un grave problème économique. Dans le

climat désertique du Néguev, nous avons pu confirmer les travaux de Poux (1950) en observant une perte de sucre liée aux phénomènes respiratoires à partir de la surmaturation (tabl. 11). Le plus important toutefois, c'est que tous ces phénomènes défavorables de la surmaturation se produisent quelle que soit la forme de conduite ou quel que soit le rendement lorsque la surface foliaire est inadéquate. Ceci confirme, à notre avis, notre thèse sur la possibilité d'obtenir de bons rendements et de bons vins en même temps, puisque les déséquilibres de la surmaturation ne sont pas liés uniquement à un haut rendement.

Dans les quatre premiers groupes de vins cités au tableau 9, il y a eu surmaturation, et les notes des vins baissent d'une manière appréciable, parallèlement au retard de la vendange dans chaque vignoble.

Dans tous les exemples cités au tableau 10 il y a surmaturation ou déséquilibre de la maturation, et toutes les notes des vins baissent même considérablement dans quelques cas (A et B, E et F, I et J) et cela malgré les dates très rapprochées des vendanges (8 jours sauf pour le cas A et B). Nous attribuons en grande partie ces irrégularités à la pourriture dont souffrent les raisins de ce cépage, à partir de la maturité physiologique, et cela quel que soit le rendement.

TABLEAU 10

Évolution de la maturation. Son influence sur la qualité des vins

Sémillon

Année	Région	Mode de conduite	Date de vendange	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Note de dégustation (0-20)	Code
1967	I	gobelet	15-8	8,9	5,18	13,11	A
			31-8	9,3	3,90	11,10	B
1968	VIII	gobelet	29-7	11,3	4,33	14,40	C
			5-8	12,2	3,68	13,70	D
1967	III	gobelet	22-8	10,3	4,44	14,12	E
			28-8	11,3	4,70	10,20	F
1968	I	gobelet	28-7	9,5	4,54	13,80	G
			4-8	10,2	4,60	12,30	H
1968	II	v. palissée	31-7	9,4	4,93	13,10	I
			7-8	10,5	5,30	11,30	J

Dans le tableau 11 nous montrons quelques cas particuliers, où la maturité reste stationnaire, malgré le retard des vendanges, et les vins E et F sont un exemple d'une diminution de l'alcool, due à l'attaque des sucres citée plus haut (Poux, 1950).

En ce qui concerne les cépages rouges étudiés, nous n'avons pas constaté les mêmes effets, à partir de la maturité physiologique. Au contraire, il y a plutôt une tendance à l'amélioration des notes dans la plupart des cas, ce qui pourrait s'expli-

quer par la nature physiologique différente des cépages rouges, par la technologie vinicole utilisée pour la vinification des vins rouges et par leur différence de composition chimique.

TABLEAU II

Évolution de la maturation. Son influence sur la qualité des vins

Sémillon

Année	Région	Mode de conduite	Date de vendange	Alcool p. 100	Ac. fixe (g/l ac. tartrique)	Note de dégustation (0-20)	Code
1967	II	v. palissée	23-8	10,5	4,96	12,75	A
			30-8	10,7	4,75	12,05	B
1968	II	gobelet	31-7	10,4	4,48	13,60	C
			7-8	10,7	4,50	12,40	D
1967	II	v. palissée	23-8	10,5	4,71	13,10	E
			30-8	9,9	4,55	12,40	F

IV. — CONCLUSION

L'examen des figures 1 à 4, où nous utilisons comme paramètres le rendement (kg/cep) en abscisse et les notes de dégustation (0-20) en ordonnée, nous permet de faire les constatations suivantes :

1° les notes des dégustations sont très variables indépendamment du rendement ; ce fait se retrouve dans les quatre cépages étudiés ;

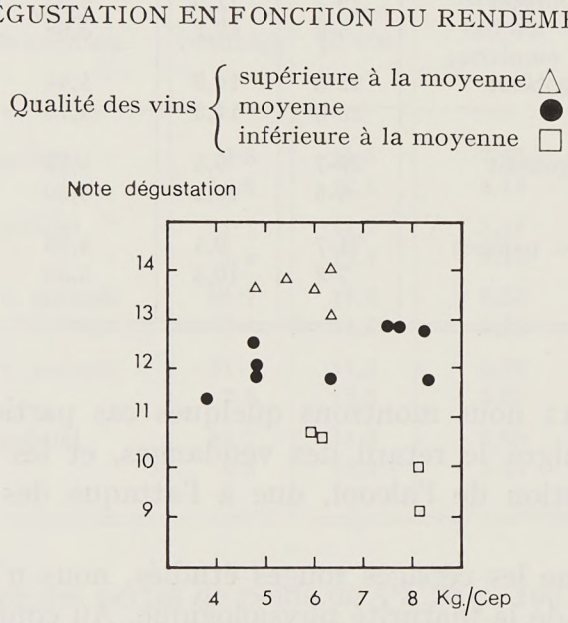


FIG. 1. — Alicante Grenache. *Sur 18 vins, les 5 meilleurs et 8 vins de qualité moyenne proviennent de vignes dont le rendement varie entre 4,5 et 8,5 kg/cep*

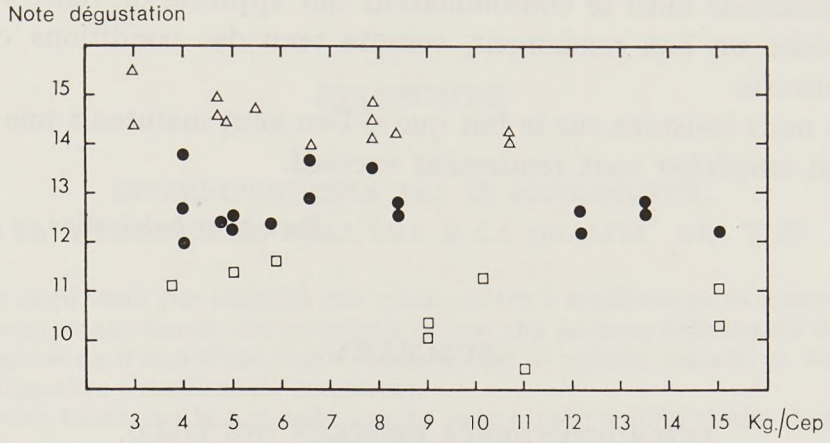


FIG. 2. — Carignan. *Sur 39 vins, il y a 9 bons vins et 12 vins de qualité moyenne provenant de vignes dont le rendement varie entre 4 et 8,5 kg/cep. En outre, 7 vins entrent dans les mêmes catégories avec des rendements beaucoup plus élevés.*

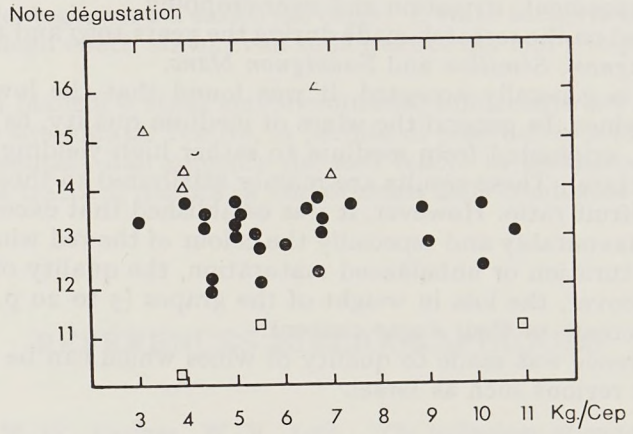


FIG. 3. — Sémillon. *Sur 33 vins, il y a 4 bons vins et 20 de qualité moyenne provenant de vignes dont le rendement varie entre 4 et 7 kg/cep*

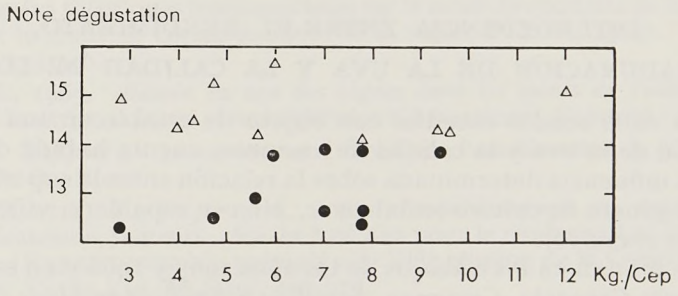


FIG. 4. — Sauvignon blanc. *Sur 20 vins, il y a 5 bons vins et 9 de qualité moyenne provenant de vignes dont le rendement varie entre 4 et 8 kg/cep*

2° les vins de qualité moyenne ainsi que la plupart des bons vins proviennent des vignes de rendements moyens aux bons rendements (4-8 kg/cep, soit 8 000 à 16 000 kg/ha).

En conséquence, la tendance actuelle vers un meilleur rendement nous paraît justifiée, puisque nous pouvons obtenir un bon équilibre entre la surface foliaire et la charge du cep et en même temps entre le rendement et la qualité des vins.

Nous satisfaisons ainsi le consommateur qui apprécie de bons vins et le viticulteur qui désire un bon rendement, compte tenu des conditions climatiques où nous nous trouvons.

Toutefois nous insistons sur le fait que si l'on veut maintenir une bonne qualité de vins, il faut empêcher tout rendement excessif.

Reçu pour publication en juillet 1971.

SUMMARY

INTERDEPENDENCE BETWEEN THE YIELD, THE MATURATION OF GRAPES AND THE QUALITY OF WINES

Studies were made in order to relate the yield, the maturation of grapes and the quality of wines, by taking into account the principal factors, which may affect the leaf surface/fruit ratio, such as form of training (bush vines against trellised vines), local growing conditions(soil-climate complex), cultural management, irrigation and over-cropping.

The results are based on the research made during the years 1967 and 1968 with four varieties: *Alicante Grenache, Carignan, Sémillon* and *Sauvignon blanc.*

Contrary to what is generally accepted, it was found that the low-yielding vines did not always make the best wines. In general the wines of medium quality, as well as the majority of the good-quality wines, originated from medium to rather high-yielding vines (4-8 kg per vine, 8 000-16 000 kg per hectare). These results are mainly attributed to those factors which cause a favourable leaf surface/fruit ratio. However, it was established that excessive yields affected the quality of the wines unfavourably and especially the colour of the red wines.

In case of over-maturation or unbalanced maturation, the quality of white wines was unfavourably affected. Moreover, the loss in weight of the grapes (5 to 20 p. 100) was insufficiently compensated by the increase of their sugar content.

In this study, reference was made to quality of wines which can be obtained under the climatic conditions of hot regions such as Israel.

RESUMEN

INTERDEPENCIA ENTRE EL RENDIMIENTO, LA MADURACION DE LA UVA Y LA CALIDAD DE LOS VINOS

Se han llevado a cabo sendos estudios con objeto de establecer una relación entre el rendimiento, la maduración de la uva y la calidad de los vinos, cuenta habida de los diversos factores que pueden tener una influencia determinada sobre la relación entre la superficie foliar y la carga de la cepa, y asimismo el género de cultivo (cubilete *vs,* viña en espaldera, viñedo, labores de cultivo, regadio y rendimiento excesivo).

Los resultados se fundan en los trabajos de los años 1967 y 1968 y en estudio de cuatro variedades de cepa : *Alicante Grenache, Carignan, Semillon* y *Sauvignan blanc.*

Contrariamente a lo admitido generalmente, se ha podido apreciar que las viñas de bajo rendimiento no son siempre las que proporcionan los mejores vinos. En general, los vinos de calidad media, así como la mayor parte de los buenos vinos, proceden de las viñas de rendimientos medios y buenos rendimientos (4-8 kg/cepa ; de 8 000 a 16 000 kg/ha).

Estos resultados pueden ser atribuidos principalmente a los factores que provocan una relación favorable entre la superficie foliar y la carga de la cepa. No obstante, se ha comprobado que ciertos rendimientos excesivos tienen efectos desfavorables respecto a la calidad de los vinos y, en particular, respecto al color de los vinos tintos.

La calidad de los vinos blancos se ha visto afectado desfavorablemente en el caso de sobremaduración y de maduración desequilibrada. Además, la pérdida de peso de las uvas (5 à 20 p. 100) queda insuficientemente compensada por el aumento de su porcentaje en azúcar.

En este estudio se trata de la calidad de los vinos obtenidos en condiciones climáticas reinantes en las regiones cálidas, como, por ejemplo, Israel.

RIASSUNTO

INTERDIPENDENZA TRA IL RENDIMENTO, LA MATURAZIONE DELL'UVA E LA QUALITA' DEI VINI

Si sono fatti degli studi per stabilire una relazione tra il rendimento, la maturazione dell'uva e la qualitá dei vini, conto tenuto dei principali fattori che possono influenzare il rapporto tra la superficie del fogliame e il carico del ceppo, come il tipo di coltura (vasetti *vs* vigna a spalliera, vigneto, cure, irrigazione e rendimento eccessivo).

I risultati sono basati sui lavori delle annate 1967 e 1968 e sullo studio di quattro vitigni : *Alicante Grenache, Carignan, Sémillon* e *Sauvignon blanc.*

Contrariamente a quello che viene ammesso in generale, si è trovato che le vigne a basso rendimento non davano sempre i migliori vini. In generale, i vini di qualità media come pure la maggior parte dei buoni vini provengono dalle vigne che hanno da rendimenti medi a buoni rendimenti (4-8 kg/ceppo ; da 8 000 a 16 000 kg/ha).

Questi risultati sono attribuiti principalmente ai fattori che provocano un rapporto favorevole tra la superficie del fogliame e il carico del ceppo. E'stato tuttavia constatato che dei rendimento eccessivi hanno degli effetti sfavorevoli sulla qualità dei vini e in particolare sul colore dei vini rossi.

La qualità dei vini bianchi è stata sfavorevolmente influenzata nel caso di sovrammaturazione e di maturazione squilibrata. Inoltre, la perdita di peso dell'uva (da 5 a 20 p. 100) è stata insufficientemente compensata dall'aumento del loro tenore in zucchero.

In questo studio, si tratta di qualità di vini ottenuti nelle condizioni climatiche delle region calde come Israele.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMERINE M. A., BERG H. W., CRUESS W. V., 1967. *The technology of wine making.* 799 p. The AVI Publishing Cy, Westport, Connecticut.

BRANAS J., 1966. La culture de la vigne dans le monde moderne : ses objectifs, ses méthodes, ses moyens. (Rapport général présenté au XIe Congrès O. I. V., 1965). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin,* **39** (419), 9-48 ; **39** (420), 141-165.

BRANAS J., 1970. Données théoriques fondamentales sur le mode de conduite de la vigne. Exposé présenté au 1er Symposium sur le mode de conduite haute de la vigne, O. I. V., 1969). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin,* **43** (470), 335-346.

BRAVDO B., GAIRON S., 1963. *Besoin en eau des vignes dans les monts de Judée. Rapport préliminaire des essais d'irrigation.* Institut national et universitaire d'Agriculture, Rehovot 15 (en hébreu).

CASSIGNARD R., 1962. *Rapport au gouvernement d'Israël sur l'amélioration de la production viti-vinicole.* Rapport nº 1520, F. A. O., Rome.

CONSTANTINESCU G., MARTIN T., NEAGU M., 1967. Enrichissement en sucre et accroissement du volume des baies : mécanisme, facteurs, rôle du feuillage pour le rendement et la qualité du raisin ; productivité du feuillage. (Rapport roumain présenté à la VIIe réunion de la Commission I, O. I. V., 1966). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin,* **40** (439), 907-917.

COSMOS I., CALO A., LIUNI C. S., 1970. Causes économiques d'évolution vers les modes de conduite haute. (Exposé présenté au 1er Symposium sur le mode de conduite haute de la vigne, O. I. V., 1969). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin,* **43** (470), 347-354.

GALLAY R., 1966. La culture de la vigne dans le monde moderne. Ses objectifs, ses méthodes, ses moyens. (Rapport suisse présenté au XIe Congrès O. I. V., 1965). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin.* **39** (427), 993-1002.

GENTILINI L., 1970. Le irrigazioni del vigneto. *Riv. Vitic. Enol.,* 112-113.

HERNANDEZ A., COULON P.-H., 1970. Causes économiques d'évolution vers les modes de conduite haute. (Communication présentée au 1er Symposium sur le mode de conduite haute de la vigne, O. I. V., 1969). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin,* **43** (472), 612-614.

HOCHBERG N., 1954. *Viticulture,* Hassadeh, 2 tomes (en hébreu).

KIEFER W., 1970. Données théoriques fondamentales sur le mode de conduite haute de la vigne. (Communication présentée au 1er Symposium sur le mode de conduite haute de la vigne, O. I. V., 1969). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin,* **43** (471), 484-487.

LOINGER C., 1965. *Rapport général sur les expériences et travaux de recherches, année 1963. Étude de la maturation des raisins et de la qualité potentielle de leurs vins.* Institut israélien du Vin.

LOINGER C., 1967. *Rapport général sur les expériences et travaux de recherches, année 1964. Étude de la maturation des raisins et de la qualité potentielle de leurs vins.* Institut israélien du Vin.

LOINGER C., 1969. *Rapport général sur les expériences et travaux de recherches, années 1965-1966. Étude de la maturation des raisins et de la qualité potentielle de leurs vins.* Institut israélien du Vin.

LOINGER C., *Rapport général sur les expériences et travaux de recherches, années 1967-1968-1969. Étude de la maturation des raisins et de la qualité potentielle de leurs vins.* Institut israélien du Vin (en cours de publication).

MAIMON A., 1961. *L'irrigation des vignes à raisins de cuve.* Thèse, Université de Jérusalem, Faculté d'Agriculture, Rehovot (en hébreu).

NAZRALA M. L., MARTINEZ PELAEZ H., 1970. Données théoriques fondamentales sur le mode de conduite haute de la vigne. (Communication présentée au 1er Symposium sur le mode de conduite haute de la vigne, O. I. V., 1969). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin*, **43** (471), 480-484.

OUGH C. S., 1965. *Report to the Government of Israel on wine production and the development of the research winery.* Report n° 2025, F. A. O., Rome.

PEYNAUD E., 1965. Le goût et l'odeur du vin. *Bull. Soc. Sci. Hyg. aliment.*, **53** (10-11-12), 249-260.

POUX C., 1950. Relation entre le poids des sucres et le poids de matière fraîche dans les raisins de différentes variétés de *Vitis vinifera* au moment de la maturité. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **36**, 605.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1952. *Conseils pratiques pour la préparation et la conservation des vins.* Conseil interprofessionnel du Vin de Bordeaux.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1960. *Traité d'œnologie*, tome I, 753 p. Librairie polytechnique C. Béranger, Paris et Liège.

ROSENTHAL S. P., LOINGER C., 1969. L'acide malique comme facteur qui influence la vinification et la conservation des vins des régions chaudes et traitements appropriés de prévention. (Communication à la 49e Assemblée générale, O. I. V., 1969). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin*, **42** (466), 1313-1318.

SAFRAN B., HOCHBERG N., 1968. Enrichissement en sucres et accroissement du volume des baies : mécanisme, facteurs, rôle du feuillage pour le rendement et la qualité du raisin ; productivité du feuillage. (Rapport présenté à la 7e réunion de la Commission I, O. I. V., 1966). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin*, **41** (446), 416-442.

SPIEGEL-ROY P., BRAVDO B., 1964. Le régime hydrique de la vigne. *Bull. Offic. internation. Vigne Vin*, **37** (396), 113-140 ; (397), 232-248.

STOEV K., 1967. Enrichissement en sucre et accroissement du volume des baies : mécanisme, facteurs; rôle du feuillage pour le rendement et la qualité du raisin ; productivité du feuillage. (Rapport général présenté à la 7e réunion de la Commission I, O. I. V., 1966). *Bull. Offic. internation. Vigne Vin*, **40** (434), 343-377.

SUDRAUD P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, 203-208.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (3), 241-264.

L'AUBERGINE (*SOLANUM MELONGENA* L.)

I. — Composition et facteurs de qualité

S. AUBERT
avec la collaboration technique de D. Novoa [1]

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84 - Montfavet

RÉSUMÉ

Une meilleure connaissance de la composition et des caractéristiques de quelques variétés d'aubergines des régions méridionales françaises doit permettre d'orienter les recherches sur l'exploitation de ce légume-fruit.

La couleur du fruit frais provient des pigments anthocyaniques, hétérosides du delphinidol, de l'épicarpe, et des chlorophylles du mésocarpe ; ces constituants peuvent être modifiés indépendamment et entre certaines limites dans la création de nouvelles variétés.

La fermeté et l'aptitude à la conservation sont fonction de la cohésion physique (masse spécifique et forme du fruit) et de la composition chimique des parois cellulaires (matières pectiques et cellulosiques).

La saveur du légume cuit et sa qualité alimentaire seront conditionnées, en grande partie, par la teneur du fruit frais en sucres et en composés sapides typiques de l'aubergine. Des essais d'identification d'un alcaloïde voisin de la solanine sont abordés.

Les variétés nouvelles de couleur blanche ou pourpre clair et à chair blanche se singularisent par leur fermeté particulière et un goût plus neutre favorables à des préparations culinaires industrielles.

Mots clés : *aubergine, composition, qualité, couleur, fermeté, sapidité.*

INTRODUCTION

L'Aubergine est un légume « fin » dont la consommation croissante se fait au détriment de légumes dits « lourds » (O. C. D. E., 1967. Publications sur l'évolution de la production maraîchère européenne).

[1] Stagiaire de l'Institut universitaire de Technologie de Grenoble (Chimie).

Ce légume-fruit entre dans de nombreuses préparations culinaires d'un attrait original et généralement peu calorifiques ; il répond bien aux besoins modernes de diversification de l'alimentation.

Le marché, qui fut longtemps essentiellement localisé sur les lieux de production méridionaux, peut s'élargir, d'une part avec l'amélioration des moyens de stockage et de transport actuels de ce fruit, et, d'autre part, avec le développement des plats préparés industriellement, par exemple du type « cuisine provençale ».

Nos connaissances sur la composition et les qualités technologiques de l'Aubergine sont très fragmentaires et se rapportent à un matériel végétal assez mal défini sur un plan variétal et écologique. On trouve peu d'études scientifiques sur l'attrait et la valeur alimentaire de ce légume, plus particulièrement en France où cette production est peu importante relativement à d'autres pays.

L'objectif de ce travail est une mise au point sur les caractéristiques et les facteurs de qualité de variétés connues, représentatives des régions traditionnellement productrices, ou récemment créées. Ce tour d'horizon des problèmes posés par l'Aubergine permettra de sérier les recherches ultérieures.

Cette étude est d'autant plus urgente que des travaux sur l'amélioration par voie génétique de cette plante ont été entrepris depuis quelques années par la Station d'Amélioration des Plantes maraîchères d'Avignon (I. N. R. A.) et plusieurs établissements français de sélection.

Il est nécessaire de préciser, de la manière la plus objective possible, les qualités physico-chimiques, organoleptiques et nutritionnelles que l'on prévoit de maintenir ou de modifier pour satisfaire le consommateur et l'industrie de la conserve.

MATÉRIEL UTILISÉ ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Échantillonnage

Trois variétés de génotypes différents ont été particulièrement étudiées:
Violette de Barbentane : lignée LF_3 (I. N. R. A.) ou *Longue noire de Provence* ; c'est la plus répandue dans les régions méridionales ; la pigmentation de sa peau est très intense et uniforme ; sa chair est verte.
Ronde de Valence : voisine du type *Ronde de Chine* ; de couleur violette panachée de vert grisâtre, sensible à la lumière, et à chair verte ; elle est très appréciée sur certains marchés.
Kantoba 245 : Création I. N. R. A. issue du croisement : *Kanto Ao* × *Violette de Barbentane* ; elle se caractérise par sa couleur blanche extérieure et intérieure ; cette lignée n'a pas encore été commercialisée. *Kanto Ao* est une variété japonaise à fruit blanc.

Deux autres lignées I. N. R. A. ont fait uniquement l'objet de déterminations sur le type de leurs pigments:
Rosie 13 : fruit de couleur violette pourpre uniforme à chair légèrement verte ; origine (*Kanto Ao* × *Violette de Barbentane*) × *Violette de Barbentane*.
Ablan 245 : fruit de couleur violette claire uniforme et à chair blanche ; origine : *Violette d'Avignon* × *Kantoba 245*.

En 1969, deux cueillettes sont espacées par 15 jours d'intervalle (fin août, début septembre). En 1970, une seule récolte (fin juillet) porte sur les fruits d'une parcelle différente de la précédente, mais de nature de sol voisine.

Les analyses classiques de composition se rapportent à un ensemble de fruits moyens, fraîchement cueillis et au stade commercial. L'échantillonnage, sur un lot plus ou moins homogène, est effectué en prélevant des quartiers, ou onglets longitudinaux, de plusieurs fruits.

Selon le constituant analysé, on utilise soit la pulpe homogénéisée, en présence d'une partie d'eau, à l'aide d'un broyeur Servall du type Omnimixer, soit le jus cellulaire non dilué provenant d'un extracteur-centrifuge Moulinex par action d'une râpe et centrifugation simultanées.

L'évolution des caractéristiques des fruits au cours de leur développement est étudiée sur un prélèvement unique comportant des fruits de toutes tailles et de tous âges physiologiques. Le facteur dimension, ou poids individuel des fruits, est le premier critère de maturité utilisé.

Déterminations physiques

La *masse spécifique* de chaque fruit est déterminée par différence de pesées, avec et sans immersion dans de l'eau à la température de 20°C environ.

Les *extraits secs* sont mesurés sur 10 g de pulpe, diluée avec une partie d'eau, par évaporation à température inférieure à 70°C et sous un vide de 750 mm de mercure.

Pour vérifier l'homogénéité des prélèvements, la matière sèche a été déterminée par dessiccation à 105°C de 200 g d'aubergine. Les teneurs sont plus faibles de 4 à 6 p. 100 par rapport à la technique précédente.

Les mesures des *indices de réfraction* pris sur le jus ont une sensibilité insuffisante, sur une échelle réfractométrique (O. P. L.) entre 3 et 5, pour être significatives dans nos confrontations.

La *fermeté* de la chair des fruits a été mesurée à l'aide d'un pénétromètre mis au point à la Station de Technologie des Produits végétaux de Montfavet. L'appareil permet de mesurer et d'enregistrer dans des conditions opératoires reproductibles la force nécessaire pour faire pénétrer dans la chair du fruit un embout cylindrique à extrémité plane d'un diamètre de 4 mm. La mesure est faite, d'une part perpendiculairement à l'axe du fruit, sur la périphérie après pelage au couteau sur 1 mm d'épaisseur environ (10 mesures réparties le long du fruit), et d'autre part sur divers points de la surface plane d'une rondelle prise au milieu du fruit (10 mesures par fruit).

La *couleur* est exprimée qualitativement à l'aide de la courbe de transmission spectrophotométrique d'un extrait éthanolique acide (éthanol 96°GL-acide chlorhydrique 2 p. 100 en volume) obtenu par diffusion de disques de peau de 20 mm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur prélevés sur plusieurs fruits.

Sur un plan quantitatif individuel, la couleur correspond à la teneur en colorants extractibles de toute la peau d'un fruit pelé au couteau, mise à macérer pendant 24 heures dans le solvant précédent. Dans ce milieu, l'extraction des pigments est rapide et quasi totale ; on filtre la solution et lave les pelures, ou disques de peau, sur verre fritté jusqu'à un volume de 200 ou 500 ml selon la richesse en colorants.

Les unités de densité optique utilisées traduisent une quantité de chromophores pour trois zones des courbes spectrophotométriques caractéristiques des deux principaux types de pigments (fig. 1) : DO 550 nm exprime un indice de composés anthocyaniques rouges, DO 425 et 660 nm correspondent à deux indices de teneur en phéophytines provenant essentiellement des chlorophylles initiales transformées par le milieu acide (WINTERMANS et DE MOTS, 1965).

Remarques sur la méthodologie.

1° Il existe une corrélation linéaire très significative entre les deux indices DO 425 et DO 660 nm ($r = 0{,}968$; limite de signification de $r = 0{,}43$ au niveau 1 p. 100) sur l'ensemble des 2 lots de fruits analysés. On peut ainsi discuter sur l'un ou l'autre des indices pour étudier la variabilité des pigments verts initiaux dans la peau des aubergines. Toutefois, cette approximation est surtout valable pour la variété *Ronde de Valence* ($r = 0{,}988$; limite $r = 0{,}60$ au niveau 1 p. 100) ; dans le cas de la *Violette de Barbentane* ($r = 0{,}574$; limite $r = 0{,}48$ au niveau 5 p. 100) les composés interférents sont plus importants. La DO 425 nm est perturbée plus particulièrement par d'autres chromophores jaunes provenant, par exemple, des polyphénols ou d'autres substances différentes des phéophytines. De plus, les dérivés de la chlorophylle sont plus importants dans la première variété ; ceci diminue l'erreur relative sur leurs indices.

2° Si on utilise l'extrait réalisé, dans les mêmes conditions d'acidité, sur un prélèvement de pulpe broyée au lieu de la peau seule, cela entraîne une dilution des chromophores et les sommets de DO des courbes spectrophotométriques considérées ne sont plus suffisamment en relief pour que les indices précédents soient acceptables. Pour étudier la teneur en chlorophylles de la pulpe seule, c'est-à-dire la couleur verte interne du fruit, un isolement préalable de ces pigments serait nécessaire.

3° Les extraits de peaux sont peu représentatifs de l'aspect externe du fruit entier. En effet, dans le milieu alcoolique acide utilisé, les chromophores anthocyaniques rouges sont augmentés alors que les chromophores verts des phéophytines sont diminués par transformation des pigments initiaux. De plus, la dispersion des colorants n'est pas homogène dans l'épiderme.

Cette dernière réserve faite, nous avons cependant cherché à exprimer l'impression visuelle donnée par les fruits intacts à partir des courbes de transmission des solutions de pigments, en utilisant la méthode tristimulaire de la Convention internationale de l'Éclairage (C. I. E.) ; ceci de la même façon que l'on mesure la couleur d'une surface colorée ou d'une pulpe vue par un observateur (MAC KINNEY et LITTLE, 1962).

En effet, les mesures réflectométriques directes sur la peau du fruit, effectuées à l'aide d'un spectroréflectomètre à sphère intégratrice (Beckman DK 2A), ne donnent pas de résultats significatifs pour les fruits de couleur foncée (*Violette de Barbentane* et *Ronde de Valence*). Dans ce cas, la méthode tristimulaire manque de précision ; on se heurte au problème de la saturation des couleurs lorsque la courbe de réflexion sur l'épiderme du fruit intact est uniforme et dans les faibles niveaux d'énergie lumineuse recueillie.

4° Par cette voie directe, on pourrait éventuellement évaluer dans l'état présent la couleur claire, de teinte plus ou moins verte, de la tranche d'un fruit. Dans ce cas, la sensibilité est bonne ; mais les chlorophylles ne sont pas uniformément réparties dans le mésocarpe. On peut aussi envisager cette mesure réflectométrique sur la pulpe homogène de plusieurs fruits.

Toutefois, l'évolution de la couleur d'une coupe ou d'un broyat est assez rapide, par suite des phénomènes de brunissement enzymatique dus aux polyphénoloxydases. Pour limiter ces artefacts, on peut opérer en présence de thiourée ou en milieu acide dès le déchirement des cellules.

Déterminations chimiques

Les analyses effectuées sur les extraits de pulpe broyée en présence d'eau donnent en général des résultats sensiblement différents de ceux obtenus sur les jus bruts non dilués provenant d'un extracteur Moulinex. Ainsi, dans le cas des sucres, les teneurs sont de 10 à 20 p. 100 supérieures. Néanmoins, nous avons souvent adopté ce dernier mode d'extraction en raison, d'une part, de sa commodité et d'une très bonne reproductibilité des mesures, et, d'autre part, de la possibilité d'opérer sur un échantillonnage beaucoup plus important de portions de fruits.

L'acidité libre des fruits est mesurée sur 20 ml de jus centrifugé, à l'aide d'un titrimètre Metrohm et dosage par la soude 0,1 N jusqu'au pH de fin de titrage de 8,1.

L'acidité totale est obtenue après transformation des sels solubles dans le milieu aqueux sur une résine cationique Dowex 50.

L'acidité combinée est représentée par la différence entre les deux dosages précédents.

Les sucres réducteurs sont évalués par dosage colorimétrique avec le ferricyanure de potassium à l'aide d'un analyseur automatique Technicon.

Les sucres totaux sont obtenus après hydrolyse préalable à l'acide chlorhydrique des sucres non réducteurs (30 minutes à 70°C dans une solution 0,15 N).

Les échantillons de jus bruts obtenus sur le broyeur-centrifuge Moulinex sont préalablement déféqués, soit au sulfate acide mercurique (méthode Sémichon et Flanzy, 1926), soit par le mélange ferricyanure de potassium et acétate de zinc. Les écarts sont négligeables entre ces deux méthodes de clarification ; on peut même éventuellement opérer sur le jus limpide dilué au 1/10 dans de l'eau.

La vitamine C (acide ascorbique total) est dosée par la méthode Ournac (1965, 1966), après défécation mercurique et formation de dinitrophénylhydrazone : d'une part sur les jus bruts centrifugés (Moulinex), d'autre part sur l'extrait de pulpe dilué à 50 p. 100.

Les composés polyphénoliques, libérés par broyage de la pulpe, sont évalués sur les extraits aqueux de pulpe ; ils ne représentent vraisemblablement qu'une fraction des polyphénols extractibles de la matière sèche. La présence de thiourée améliore très sensiblement les résultats en limitant les phénomènes d'oxydation.

La méthode de dosage des polyphénols (tanins) de l'A. O. A. C. (1960), fondée sur la réduction du réactif de Folin-Denis, s'applique à l'évaluation de l'ensemble des hydroxyles phénoliques qui appartiennent essentiellement aux substrats d'oxydation de l'aubergine (acides benzoïques, cinnamiques et flavonoïdes).

Les composés pectiques sont dosés par colorimétrie avec le carbazol sulfurique ; l'étalon est l'acide galacturonique.

On extrait successivement, sur 100 g de pulpe diluée, deux fractions : les pectines solubles dans l'eau sont purifiées par plusieurs précipitations dans l'éthanol à 80 p. 100 ; les protopectines sont solubilisées à partir de la même prise d'essai, par addition d'acide chlorhydrique (milieu 0,2 N). Les pectines totales représentent la somme des deux dosages précédents.

Les composés cellulosiques sont estimés, selon la méthode de Weende, par pesée de l'insoluble récupéré après digestion de 50 g de pulpe diluée et finement broyée, correspondant à environ 2 g de matière sèche, d'abord dans 300 ml d'acide sulfurique à 1,25 p. 100 en poids, au reflux 30 mn avec une agitation régulière en évitant les surchauffes sur le fond du ballon ; ensuite, dans 300 ml de soude à 1,25 p. 100 en poids, au reflux 30 mn en agitant. Après centrifugation, les séparations sont complétées par passage sur filtre rapide en cellulose, ou mieux en téflon, lavé et taré préalablement. Le résidu est lavé à l'eau, l'alcool, l'acétone et l'éther ; puis, il est séché sous vide et enfin à l'étuve à 100-105°C jusqu'à poids constant.

Les protides sont évalués par dosage de l'azote total sur la pulpe, selon la méthode de Kjeldahl, avec un coefficient de transformation de 6,25.

Les substances minérales sont représentées par les dosages classiques suivants :

Cendres. — Elles sont pesées après calcination au four, à 600°C pendant 15 heures, de 5 g de matière sèche. On solubilise à chaud par 1 ml d'acide nitrique pur et le volume est amené à 200 ml avec de l'eau bidistillée.

Sodium, potassium. — Ces éléments sont dosés par spectrométrie de flamme (Eppendorf).

Calcium, fer, magnésium. — Ils sont obtenus par absorption atomique (Perkin-Elmer).

Analyses qualitatives

Sucres.

La nature des sucres des extraits aqueux du jus d'aubergines déféqué est déterminée par chromatographie sur colonne de résines, à l'aide du montage et des tampons standards d'un analyseur automatique (Technicon). La réaction très sensible des sucres avec l'orcinol sulfurique permet d'opérer avec une dilution du jus d'aubergine au 1/50 dans de l'eau pour une injection de 0,2 à 0,5 ml en tête de colonne (2 à 100 microgrammes de sucres). L'étalonnage est fait sur les sucres témoins : saccharose, glucose, fructose et galactose.

Anthocyanes de l'aubergine.

L'identification des pigments anthocyaniques porte sur des extraits au méthanol-chlorhydrique, à 0,5 p. 100 en volumes, de peaux fraîches mises à macérer sans broyage. Le fractionnement des différents composés est réalisé, d'une part par chromatographie sur papier (Whatmann n° 1), d'autre part sur couche mince de cellulose (Machery, Nagel et Co, MN 300). Différents solvants de migration utilisés sont de nature hydro-alcoolique et acide ; plus particulièrement le mélange butanol-acide acétique-eau (4-1-5) donne de bonnes séparations en utilisant la phase aqueuse.

Les dépôts diversifiés de substances s'effectuent soit directement, après concentration sous vide à basse température des extraits alcooliques, soit après purification par formation d'un complexe entre les substances polyphénoliques et un sel de métal lourd. Dans cet isolement préalable, on a utilisé préférentiellement le sulfate acide mercurique (Flanzy et Aubert, 1968), mais l'acétate de plomb neutre ou basique (Deibner et Bourzeix, 1963) peut donner les mêmes résultats. Une purification éventuelle supplémentaire du complexe est possible, en le dissolvant dans du méthanol-chlorhydrique, puis en repassant en phase aqueuse où l'on précipite les anthocyanes par addition de 3 volumes d'éther éthylique (Nagashima, Taira, 1965).

Les aglycones ont été plus spécialement identifiés selon la technique de Nybom (1964), par chromatographie sur couche mince, comparativement à des étalons de chlorure de delphinidol et de chlorure de cyanidol commerciaux (Fluka, qualité *puriss.*).

Les hétérosides sont étudiés par libérations successives de leurs substituants glucidiques par hydrolyse ménagée avec chauffage progressif dans le méthanol chlorhydrique, selon la technique utilisée par plusieurs auteurs (Sakamura *et al.*, 1963 ; Casoli et Dall'Aglio, 1966).

Les hétérosides, isolés et purifiés par précipitation au sulfate mercurique (Flanzy et Aubert, 1968), sont hydrolysés totalement par chauffage en milieu chlorhydrique 2 N. Les sucres libérés sont séparés par défécation mercurique des aglycones. La nature et les teneurs respectives en sucres des hétérosides sont déterminées par chromatographie sur Technicon, comparativement à des étalons de rhamnose et glucose.

Les substituants acylés éventuels (acide paracoumarique recherché) sont hydrolysés en milieu sodique, réacidifiés, extraits à l'éther ou à l'acétate d'éthyle, puis identifiés par chromatographie, selon les techniques de Ribéreau-Gayon (1964, 1968) et Sumere *et al.* (1965).

La caractérisation des anthocyanes isolées par chromatographie se fait par la méthode spectrographique de Harborne (1958). Les taches sur couche mince de cellulose sont aspirées dans un tube garni d'un tampon de laine de verre, éluées par un alcool et la solution est filtrée sur « Millipore » en Téflon. On trace la courbe d'absorption dans le visible et l'UV, à l'aide d'un spectrographe Beckman DK 2A.

Recherches des alcaloïdes de Solanées.

Divers essais d'identification de glycoalcaloïdes stéroïdes, du type de la solanine, ont été effectués sur la pulpe d'aubergine selon une méthode classique. Les fruits frais broyés sont extraits par de l'alcool acétique (2 à 5 p. 100) ; on chasse l'alcool et la base est précipitée à froid en milieu ammoniacal (pH = 9-10). La recristallisation se fait généralement dans les mélanges alcool-eau ou dioxanne-eau.

Cet isolement quantitatif et une purification suffisante sont nécessaires à défaut de réactif de dosage très spécifique de ces substances. Dans le cas des alcaloïdes de Solanées, on utilise fré-

TABLEAU I

Composition des aubergines

Constituants Teneurs pour 100 g de matière fraîche crue	*Violette de Barbentane*	*Kantoba 245*	*Ronde de Valence*	Littérature
Poids moyen/fruit (g) (Récolte 69/70)	190	175	265	Références
Extrait sec (g)	7,5	7,8	9,3	8 % [a] 8 à 10 [d]
Cendres (mg p. 100 g MS)	8 542 (1 140*)	8 083 (1 035*)	6 524 (702*)	
Sodium (mg p. 100 g MS)	25,7 (3,4*)	29,4 (3,8*)	26,4 (2,8*)	2,5*[b] 5*[a]
Potassium (mg p. 100 g MS)	4 080 (545*)	3 380 (434*)	2 860 (297*)	238*[b] 220*[a]
Calcium (mg p. 100 g MS)	97,5 (13*)	87,5 (11,2*)	70,0 (7,5*)	10,4*[b] 12*[e]
Fer (mg p. 100 g MS)	4,0 (0,53*)	3,6 (0,46*)	3,5 (0,38*)	0,39*[b] 0,3*[e] 0,5*[a]
Magnésium (mg p. 100 g MS)	238 (32*)	214 (27,5*)	174 (18,5*)	9,5*[b] 12*[a]
pH (des jus bruts)	5,85	5,85	5,70	
Acidité (méq.) libre	1,7 (113*)	1,6 (107*)	1,2 (80*)	(mg* ac. malique libre calculé)
Acidité (méq.) combinée	7,0 (467)	6,6 (440)	3,2 (214)	(étalon ac. malique)
Acidité (méq.) totale	8,7 (580)	8,2 (547)	4,4 (294)	— —
Sucres (g) totaux	2,5 à 4,0	2,6 à 3,8	4,0 à 5,0	3,1[b c] 5,5[a]
Sucres (g) réducteurs	2,0 à 3,2	2,0 à 3,2	3,2 à 3,8	2 à 3 %[d]
Pectines solubles (g)	0,055	0,063	0,026	0,180 à 0,350[g]
Protopectines (g)	1,820	2,180	0,445	0,330 à 0,620[f] en pectate de Calcium
Matières cellulosiques (g)	0,730	0,950	0,775	
Matières polyphénoliques (g)	0,21 (0,62)	0,26 (0,74)	0,23 (0,79)	g d'ac. gallique étalon (en présence de thiourée) [d]
Vit. C (mg d'acide déhydro-ascorbique	4,1*-4,7*	2,7*-3,4*	3,5*-3,8*	4*[e] 5*[c] 4 à 8*[a] 3 à 5*[d]
Protides (N × 6,25) (g)	0,87	0,72	0,91	0,7[b] 1,3[a]

[a] CAUSERET (1960) : Cu = 0,10 ; P = 15 ; S = 16 ; Cl = 50 ; Lipides = 0,2 g ; Calories = 29.
[b] FOOD IND. MANUAL (1958) : Cu = 0,08 ; P = 12 ; S = 9 ; Cl = 61 ; Lipides = traces ; Calories = 15.
[c] FORTE (1966) : Fe = 0,4 ; P = 37 ; Protéines = 1,2 g ; Calories = 17 ; Vit. A = 30 UI ; Vit. B_1 = 40 UI ; Vit. B_2 = 50 UI.
[d] FILLIPPOVA et BELOVA (1963) : Tanins = 200 mg ; Protéines = 1 g.
[e] O. E. C. E.-A. E. P. (1960) : Vit. A = 25 UI ; Vit. B_1 = 0,03 mg ; Vit. B_2 = 0,04 mg ; Vit. PP = 0,05 mg.
[f] CORRAO (1956) en pectine soluble pure précipitée par de l'éthanol 60 p. 100 et exprimée en pectate de calcium.
[g] En 1971, des mesures effectuées sur la *Violette de Barbentane*, par précipitation avec de l'éthanol 80 p. 100 minimum, nous ont donné les résultats : pectines solubles = 0,100 à 0,500 (ac. galacturonique) ; pectines totales = 0,900 à 1,600 g.
* = mg p. 100 matière fraîche

quemment pour leur évaluation la formation d'une combinaison de couleur pourpre intense en présence d'une solution diluée à 1 p. 100 de paraformaldéhyde dans un milieu acide fort (SO_4H_2 et PO_4H_3). De nombreuses réactions générales de caractérisation des alcaloïdes sont aussi utilisables (CROMWELL, 1955).

RÉSULTATS

Le tableau 1 donne la composition moyenne des lots de trois variétés d'aubergines des récoltes 1969 ou 1970, comparativement aux données générales de la littérature. En additif sont rapportés des dosages d'éléments non déterminés dans ce travail, mais signalés par d'autres auteurs.

La variabilité des mesures, en fonction de la grosseur et du nombre de fruits analysés, sera discutée ultérieurement sur quelques analyses particulièrement intéressantes sur un plan technologique.

Les caractéristiques variétales seront étudiées en trois rubriques qui représentent trois critères de qualité essentiels pour ce légume-fruit : *l'aspect et la couleur*, plus spécialement, dont les données sont en majeure partie rassemblées dans les figures 1 à 4, *la tenue ou résistance mécanique* aux manipulations, exprimée sous la forme des graphiques de fermeté (fig. 5 à 7), le *goût et l'intérêt nutritionnel*, dont un des éléments chiffrés est la teneur en sucres (tabl. 2).

DISCUSSION

Observations générales

Les critères de récolte des aubergines sont particulièrement imprécis et empiriques. On admet très subjectivement que les fruits les plus tendres et les plus « fins » sont ceux cueillis précocement et généralement les plus petits. Ces jeunes fruits ont cependant une très mauvaise aptitude à la conservation en frais, par suite de leur flétrissement rapide. Inversement, la maturité commerciale la plus économique correspond à un poids unitaire élevé compatible avec une bonne acceptation visuelle et gustative par le consommateur, mais les fruits très développés et apparemment trop vieux sont généralement délaissés.

La coloration et le durcissement des grains est un indice de maturité peu pratique et seulement utilisable sur des lots importants où la perte par prélèvement, en ouvrant des fruits, serait minime.

Un repère de cueillette, peu connu de la ménagère, est le renforcement du fruit au niveau du calice dès la fin de la période de croissance rapide. A maturité commerciale « dépassée », la forme évolue d'un cône vers un cylindre et la fermeté du fruit devient excessive ; de plus, on observe une légère décoloration de la peau.

Une couleur violacée-noire uniforme et brillante sur tout le fruit est généralement recherchée, sans justification immédiate ; mais cette qualité est considérée comme associée à la fraîcheur du produit, car en cours de conservation les fruits deviennent brunâtres et ternes.

Sur un autre plan, l'appréciation de la qualité gustative après cuisson est très variable suivant les personnes. Les goûts sucré et piquant-amer, typiques de l'Aubergine, sont plus ou moins appréciés selon le consommateur. D'une part, une meilleure définition et une certaine « harmonie » dans ces caractéristiques doivent

être recherchées. D'autre part, une diversification des productions est souhaitable et ce légume doit, par exempie, convenir à différentes préparations industrielles. Ainsi, le facteur fermeté est recherché ou non suivant le mode de conservation.

La normalisation des variétés retenues sur ces divers critères de qualité devra s'adapter à la destination des produits.

Une des difficultés principales de cette étude est l'extrême variabilité de plusieurs caractères des individus, même choisis avec une dimension et un aspect comparables dans un lot homogène ; ceci pose des problèmes d'échantillonnage particulièrement délicats, compte tenu de la faible quantité de matière traitée sur des fruits relativement gros, dans les conditions opératoires d'un laboratoire. Nous avons dû nous limiter, avec les moyens accordés à cette recherche, à faire quelques extrapolations sur les résultats obtenus sans tenir toujours précisément compte des écarts entre individus dans des états physiologiques différents et dans les conditions écologiques des récoltes 1969 ou 1970. Une expérimentation plus exhaustive demanderait un échantillonnage abondant, un nombre plus grand de cueillettes étalées dans le temps, avec des facteurs culturaux très distincts, pour que les conclusions tirées sur les différences variétales soient absolument généralisables.

A. — *La couleur*

1. — *Différents pigments anthocyaniques de l'aubergine.*

La nature des pigments responsables de la couleur des aubergines est connue depuis les travaux de chercheurs japonais, car le Japon est un pays gros producteur et consommateur. La teinte violacée du fruit est due à la présence d'anthocyanines pourpres dont l'aglycone essentiel est le delphinidol, du moins dans les cultivars d'Extrême-Orient.

Kuroda et Wada (1933, 1935) isolèrent les premiers la nasunine dont la formule donnée est le delphinidol 3-diglucoside acylé par l'acide paracoumarique. La structure de ce constituant principal fut précisée par Abe et Gotoh (1957, 1959), puis par Sakamura, Watanabe et Obata (1963, 1965, 1966). Les variétés d'origine orientale contiennent essentiellement du delphinidol-5-glucoside-3 (4 (*p*-coumaryl) L-rhamnosyl-(1-6)-glucoside)), ou, sous forme d'abréviation commode, le delph.-5 glucose-3 rutinose/*p*-coumarique (fig. 1).

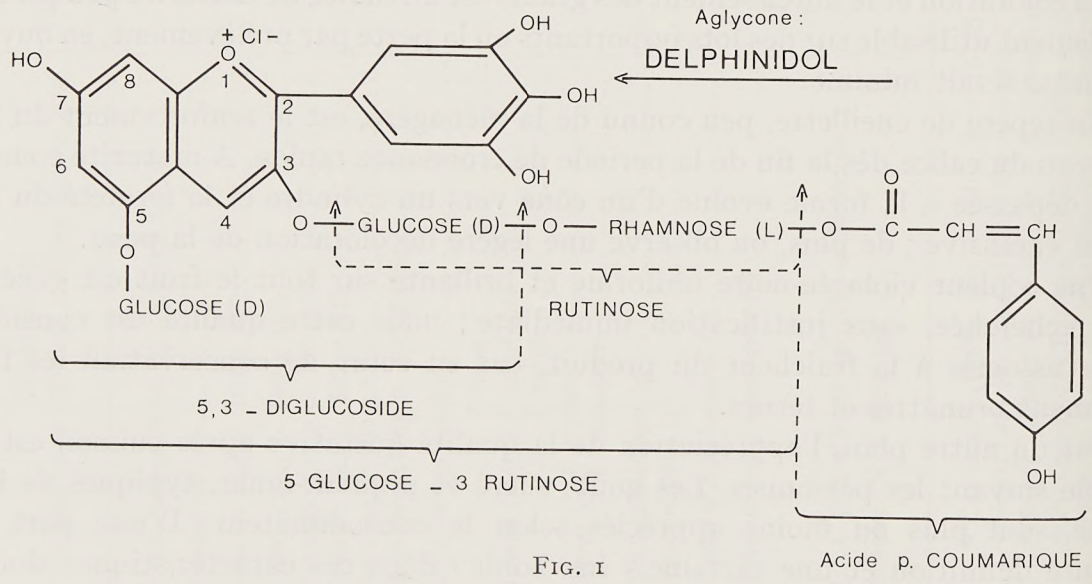


Fig. 1

CASOLI et DALL'AGLIO (1969) identifient dans les variétés italiennes différentes taches chromatographiques. Ils attribuent la principale au dérivé delph.-3 rutinose acylé et deux autres, moins importantes, au delph.-5 glucose-3 rutinose et au delph.-3 glucose. La preuve de l'acylation n'est pas faite pour ces dernières; par contre, la différenciation des glucosides n'apparaît pas attribuable à une hydrolyse des substituants pendant l'extraction des pigments.

PIFFERI et SAMORANI (1969) confirment ces résultats et signalent la présence d'autres hétérosides comme le delph.-5 glucose-3 caféoyl glucose.

TANCHEV, RUSKOV et TIMBERLAKE (1970) montrent que les cultivars bulgares se distinguent des variétés orientales par l'acylation des pigments de ces dernières par l'acide *p*-coumarique. Pour l'aubergine typique de leur région, ces auteurs trouvent principalement le dérivé delph.-3 rutinose et moins de delph.-5 glucose-3 rutinose, non acylés.

A l'heure actuelle, l'hypothèse de TIGCHELAAR, JANICK et ERICKSON (1967) apparaît partiellement vérifiée. La pigmentation par un anthocyane dominant d'une variété d'aubergine serait conditionnée par la transformation du delph.-3 rutinose en nasunine. Néanmoins, il n'est pas certain que le même gène (*Ac*) contrôle en même temps la fixation du reste acide *p*-coumarique et la glucosification en 5.

Les résultats de nos analyses permettent de vérifier la prédominance certaine du noyau delphinidol dans toutes les variétés étudiées. La preuve est faite par chromatographie des extraits, purifiés ou non, sur des supports et avec des solvants différents, comparativement à un étalon de chlorure de delphinidol. Le profil des spectres d'absorption des solutions alcooliques de cet aglycone, dans le visible et l'UV, est caractéristique ; ainsi, un déplacement bathochrome de 30 nm en présence de chlorure d'aluminium confirme la structure orthohydroxylée.

Toutefois, sur des extraits de pigments non purifiés, on a observé sur couche mince des taches faibles et peu stables correspondant au chlorure de cyanidol. L'hydrolyse préalable en milieu chlorhydrique permet de supposer la formation d'un artefact provenant des leucoanthocyanes; mais ces dernières sont mal révélées sur un extrait de pulpe. WATANABE *et al.* (1966) ont aussi signalé la présence de cyanidol-5 glucose-3 rutinose/*p*-coumarique. Néanmoins, cette anthocyane n'intervient pas sensiblement dans la couleur des cultivars actuels.

Pratiquement, les hétérosides du delphinidol seul permettent de différencier les variétés étudiées. La couleur, ou plutôt la teinte dominante, des aubergines se situe ainsi dans des limites étroites du violacé au pourpre. De plus, ce type de pigment est particulièrement dégradable (LAMORT, 1958) ; ceci implique des effets technologiques ; par exemple, la perte de couleur en conserve stérilisée sera importante.

Néanmoins, les substituants vont conditionner la stabilité du pigment et distinguer les fruits. *Violette de Barbentane* contient essentiellement du delph.-3 rutinose et très probablement du delph.-5 glucose-3 rutinose. Par chromatographie sur couche mince de l'extrait initial, on sépare l'anthocyanine principale représentant 75 à 80 p. 100 de la coloration rouge totale, donnée par la DO à 550 nm, d'une deuxième tache correspondant à 20-25 p. 100 des chromophores exprimés par cet indice.

Les sucres, analysés par chromatographie sur Technicon, sont dans le rapport glucose/rhamnose égal à 1,43 moles ; ceci est théoriquement en accord avec les pourcentages précédents.

L'hydrolyse chlorhydrique ménagée permet d'obtenir cinq taches distinctes, plus ou moins abondantes, compatibles avec les différentes scissions des deux hétérosides. La présence de glucose en position 5 est ainsi confirmée pour ce pigment non dominant, mais son acylation est incertaine.

La *Ronde de Valence* et les variétés intermédiaires, *Rosie 13* et *Ablan 245*, renfermeraient essentiellement la nasunine. En effet, on observe par chromatographie de leurs extraits des Rf particulièrement élevés pour une seule tache apparente. De plus, l'acide *p*-coumarique est révélé sur les chromatogrammes des extraits après scission alcaline de ce substituant. D'autre part, après isolement de l'anthocyane par le sulfate mercurique et chromatographie des seuls sucres attachés à l'aglycone, on trouve un rapport glucose/rhamnose voisin de 4 pour cet hétéroside. Cette valeur particulièrementé élevée en glucose et l'examen des taches chromatographiques sont favorables à la forme 5-3 diglucoside acylé. Toutefois, une hydrolyse partielle au milieu du rutinose ou l'isolement d'une forme 3-diglucoside acylé ne sont pas totalement à exclure dans les extraits de ce type d'aubergine.

Une hypothèse plausible est que la glucosification en 5 se dissocie bien de l'acylation du 3-rutinose dans la biosynthèse de ces anthocyanes. Les identifications du précurseur commun, flavanonol ou flavénol par exemple, et des nombreux gènes responsables de la couleur des anthocyanes, entrent dans un cadre de recherches biochimiques et génétiques fondamentales (Harborne, 1962, 1964, 1965).

Pochard (1964, 1965), par extraction des pigments en milieu acide (HCl N) et examen visuel, a montré que l'on pouvait classer les différents cultivars (environ 100 génotypes différents examinés) en deux groupes principaux.

Une coloration mauve violacée caractérise le groupe oriental, le plus nombreux, dont fait partie la *Ronde de Valence* ainsi que tous les cultivars reçus du Japon, de Chine et des Indes.

Une coloration pourpre correspond au groupe occidental où figurent la *Violette de Barbentane* et les variétés similaires cultivées sur le pourtour méditerranéen.

L'examen des disjonctions dans le croisement *Kanto Ao* × *Violette de Barbentane* montre que ces deux cultivars diffèrent par la composition allélique à trois locus indépendants contrôlant différentes étapes de la biosynthèse des pigments anthocyaniques. L'étude du croisement *Violette de Barbentane* × *Ronde de Valence* montre que la coloration pourpre est liée à un gène récessif. D'autre part, l'insensibilité à la lumière est sous la dépendance de deux gènes complémentaires ; elle ne dépend pas de la nature du pigment concerné (pourpre ou mauve).

La *Violette de Barbentane* se distingue ainsi des croisements obtenus à partir des variétés orientales par une formation différente des hétérosides du delphinidol ; cette variété est riche en chromophores pourpres uniformément répartis sur tout l'épiderme du fruit.

La *Ronde de Valence* et les variétés intermédiaires se caractérisent par l'acylation de leur anthocyanine, semblable aux fruits orientaux.

D'autre part, l'absence de pigmentation sous le calice (gène « Puc » des auteurs précédents, Tigchelaar *et al.*, 1968) sera un autre facteur de différenciation. La lumière étant nécessaire à la formation du pigment, les parties du fruit les moins éclairées sont plus pâles ; c'est le cas typique de la *Ronde de Valence*.

Les mesures quantitatives suivantes révèlent que la densité superficielle relative des chromophores anthocyaniques rouges et des chromophores verts des chlo-

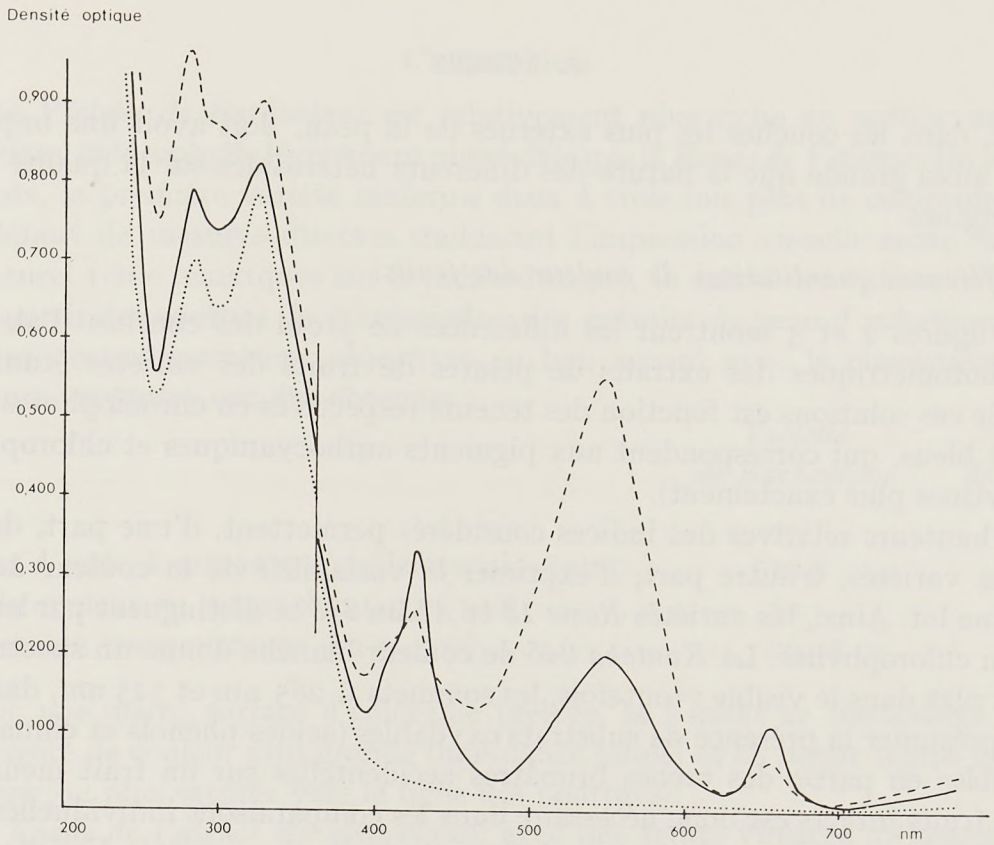


FIG. 2. — *Spectres d'absorption des extraits alcooliques acides de peaux d'aubergine.*

Variétés : ——— *Ronde de Valence*
– – – – – – *Violette de Barbentane*
. . . . . *Kantoba 245*

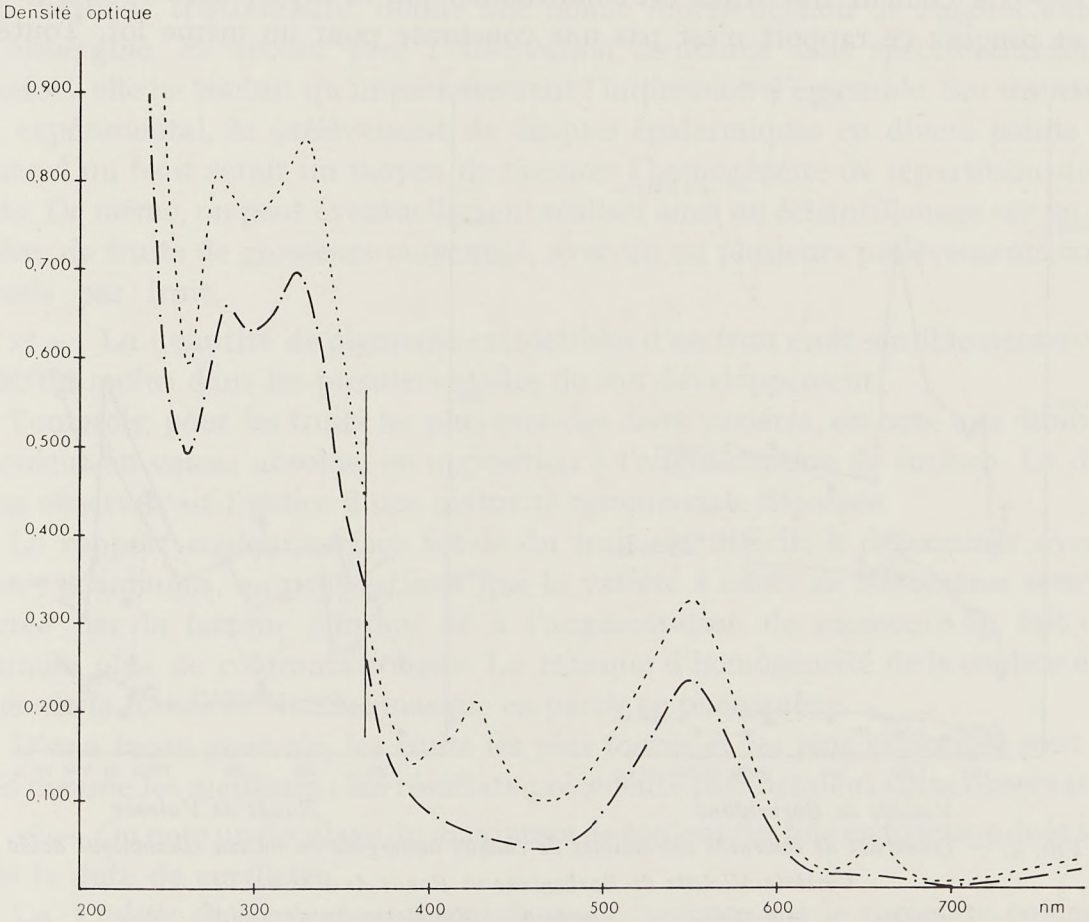


FIG. 3. — *Spectres d'absorption des extraits alcooliques acides de peaux d'aubergine.*

Variétés : . . . . . *Rosie 13*
–·–·–·– *Ablan 245*

rophylles, dans les couches les plus externes de la peau, doit avoir une importance pratique aussi grande que la nature des différents hétérosides sur la qualité visuelle des aubergines.

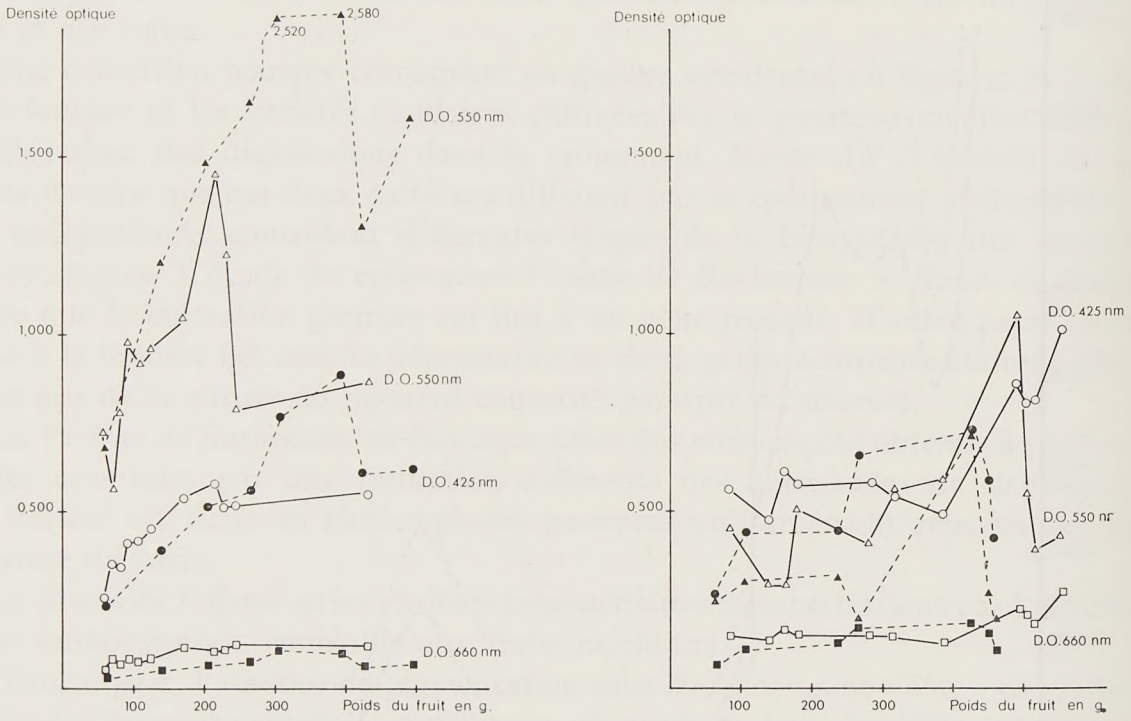
2. — *Différences quantitatives de couleur des fruits.*

Les figures 2 et 3 montrent les différences de profil des courbes d'absorption spectrophotométriques des extraits de pelures de fruits des variétés étudiées. La couleur de ces solutions est fonction des teneurs respectives en chromophores jaunes, rouges et bleus, qui correspondent aux pigments anthocyaniques et chlorophylliens (phéophytines plus exactement).

Les hauteurs relatives des indices considérés permettent, d'une part, de caractériser les variétés, d'autre part, d'exprimer la variabilité de la couleur des fruits d'un même lot. Ainsi, les variétés *Rosie 13* et *Ablan 245* se distinguent par leur faible teneur en chlorophylles. La *Kantoba 245* de couleur blanche donne un spectre pratiquement plat dans le visible ; toutefois, les sommets à 285 nm et 325 nm, dans l'UV, laissent présumer la présence de substrats oxydables (acides phénols et cinnamiques) responsables en partie des taches brunâtres accidentelles sur un fruit meurtri. Un choix de fruits intacts est donc nécessaire dans les comparaisons individuelles.

La figure 4 juxtapose deux populations de fruits des variétés *Violette de Barbentane* et *Ronde de Valence*, après extraction totale des pelures de tout l'épiderme des fruits cueillis à des grosseurs et à des époques différentes. Les observations faites seront donc générales.

1° — La couleur des fruits est conditionnée par la superposition des pigments verts et rouges ; ce rapport n'est pas une constante pour un même lot. Toutefois,



Violette de Barbentane *Ronde de Valence*

FIG. 4. — *Quantités de colorants extractibles de chaque aubergine en milieu éthanolique acide*
Variétés *Violette de Barbentane* et *Ronde de Valence.*

—□—□— —○—○— —△—△—△— (Cueillette du 15 Août)
—■—■— —●—●— —▲—▲—▲— (Cueillette du 1er Septembre)
Phéophytines Anthocyanes

la variété *Violette de Barbentane* est relativement plus riche en anthocyanes avec une teneur en chlorophylle légèrement plus faible que la *Ronde de Valence*. En moyenne sur les lots, la première variété renferme deux à trois fois plus de colorants rouges.

A défaut de mesures directes traduisant l'impression visuelle reçue du fruit à l'état naturel (voir remarques sur la méthodologie), le calcul des valeurs trichromatiques à partir des courbes de transmission des extraits de peau d'aubergine permet néanmoins des comparaisons objectives en bon accord avec le classement visuel. Les valeurs suivantes ont été obtenues :

	Violette de Barbentane	*Ronde de Valence*
	—	—
Longueur d'onde dominante complémentaire (nm)	519,5	527
Pureté de couleur ou saturation (en p. 100)	52	44
Luminance ou transmittance (en p. 100)	29,45	35,40

Pour une même surface d'épiderme prélevé, la *Violette de Barbentane* donnera une intensité de couleur plus grande (luminance faible) et en même temps une teinte plus rouge (ou plus saturée vers la ligne des pourpres).

La *Ronde de Valence* est plus claire, avec une teinte violacée mélangée de vert et moins franche, c'est-à-dire moins pure.

Les variétés intermédiaires, *Rosie 13* et *Ablan 245*, ont une pureté de teinte supérieure à la précédente, avec des luminances situées entre les valeurs des deux variétés témoins précédentes. La couleur des extraits alcooliques, exprimée à l'aide de la méthode tristimulaire, donne une bonne représentation de l'aspect extérieur de l'aubergine, en accord avec l'observation commune sans spectroréflectomètre. Toutefois, elle ne traduit qu'imparfaitement l'impression d'ensemble. Sur un nouveau plan expérimental, le prélèvement de disques épidermiques en divers points de la surface d'un fruit serait un moyen de mesurer l'homogénéité de répartition des pigments. De même, on peut éventuellement réaliser ainsi un échantillonage sur un grand nombre de fruits de grosseurs moyennes, avec un ou plusieurs prélèvements conventionnels par fruit.

2° — La quantité de pigments extractibles d'un fruit croît sensiblement avec son poids, du moins dans les premiers stades de son développement.

Toutefois, pour les fruits les plus gros des deux variétés, on note une diminution de couleur en valeur absolue, en opposition à l'augmentation de surface. La décoloration observée est l'indice d'une maturité commerciale dépassée.

Le rapport couleur/surface totale du fruit est difficile à déterminer avec précision ; néanmoins, on peut estimer que la variété *Violette de Barbentane* sera moins affectée par le facteur dilution lié à l'augmentation de grosseur, du fait qu'elle accumule plus de colorants rouges. Le manque d'homogénéité de la couleur épidermique de la *Ronde de Valence* masque en partie ce phénomène.

D'une façon générale, les fruits les plus foncés et les plus uniformes sont considérés comme les meilleurs ; les résultats précédents justifieraient cette observation.

3° — On note un décalage du maximum de couleur des lots en fonction de la variété et de la date de cueillette.

La *Violette de Barbentane* apparaît moins précoce sur le caractère couleur que la *Ronde de Valence*, indépendamment d'autres critères de maturité. Pratiquement,

la première variété bénéficiera d'une cueillette plus tardive, avec des fruits assez gros. La *Ronde de Valence* gagnera à être cueillie plus tôt, avec des fruits relativement plus petits, pour que l'aspect du lot soit plus agréable.

Nous soulignerons aussi la variabilité entre les fruits d'un même lot et de cueillettes différentes.

En définitive la qualité de couleur des aubergines est conditionnée par la quantité et la répartition des pigments pourpres ou violacés de l'épiderme de chaque fruit. Les chlorophylles interviennent pour donner une teinte moins pure, en fonction de leur concentration dans les couches les plus externes du mésocarpe. Tous ces facteurs sont indépendants et se prêtent bien à des améliorations par création de nouvelles variétés. De plus, un choix judicieux des périodes de cueillette peut assurer une meilleure exploitation des variétés traditionnelles. Les techniques et les critères proposés constituent un moyen pour tester objectivement la valeur de nouvelles créations. Les variétés intermédiaires, *Rosie 13* et *Ablan 245*, constituent un progrès sur le plan uniformité et pureté de couleur. Toutefois, l'acceptation de ces nouveautés par le consommateur dépend de facteurs mal connus, liés aux habitudes alimentaires et à des associations subjectives couleur-goût que nous envisagerons ultérieurement.

B. — *Fermeté des fruits frais*

Cette étude porte sur les qualités potentielles du fruit fraîchement cueilli sur le plan de sa résistance mécanique aux manipulations, indépendamment des modifications qu'il peut subir pendant sa conservation plus ou moins prolongée et par des traitements avant consommation.

La fermeté est fonction de plusieurs facteurs : forme géométrique, structure physique et composition chimique de la chair, dont l'influence respective est difficile

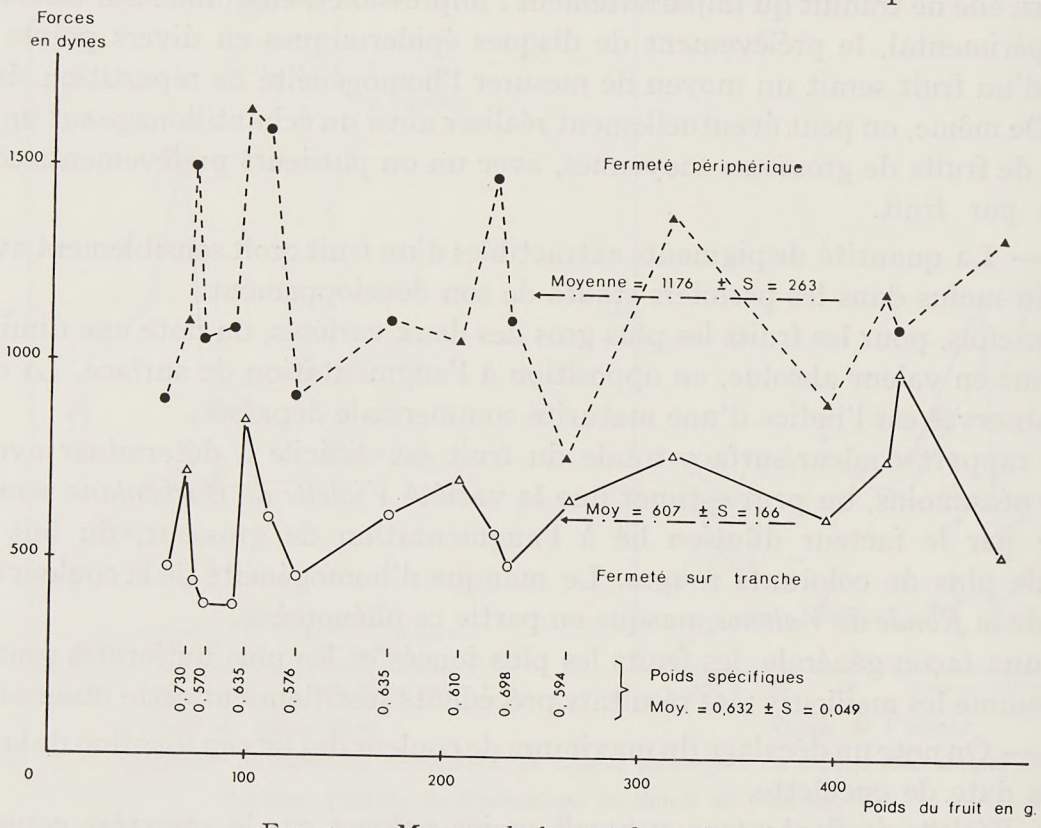


FIG. 5. — *Mesures de fermeté des aubergines.*
Variété *Violette de Barbentane* (voir légende fig. 4).

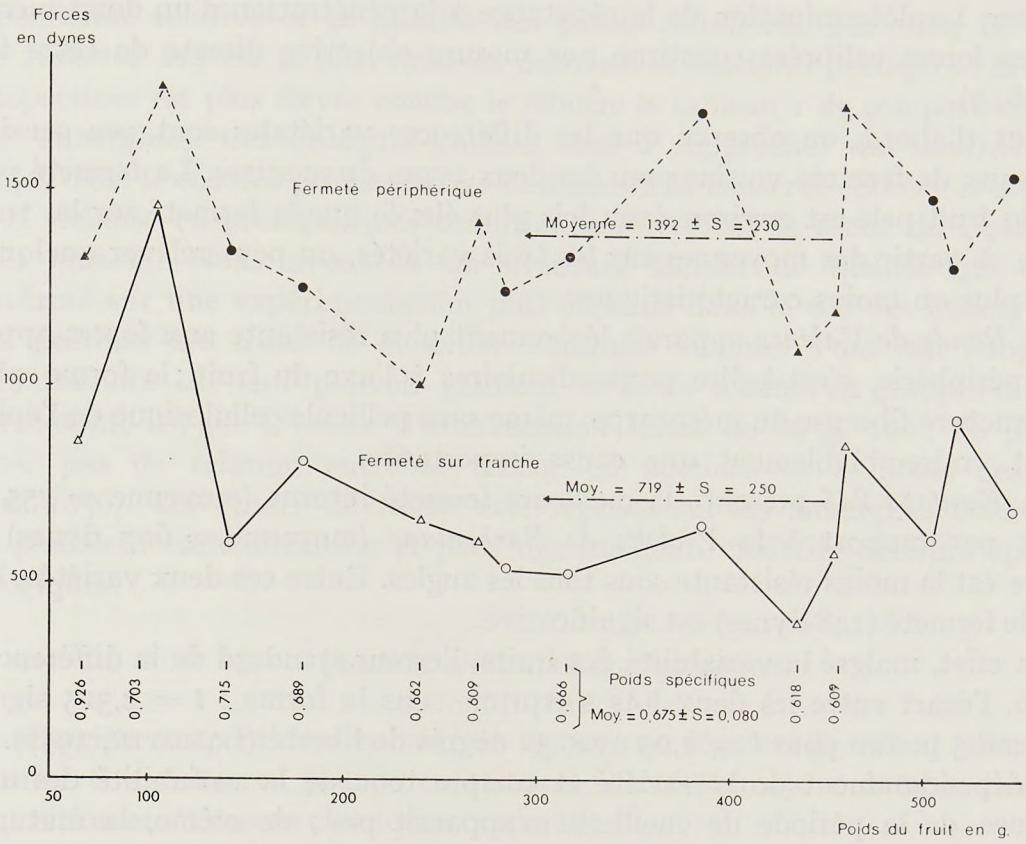


FIG. 6. — Mesures de fermeté des aubergines.
Variété *Ronde de Valence* (voir légende fig. 4).

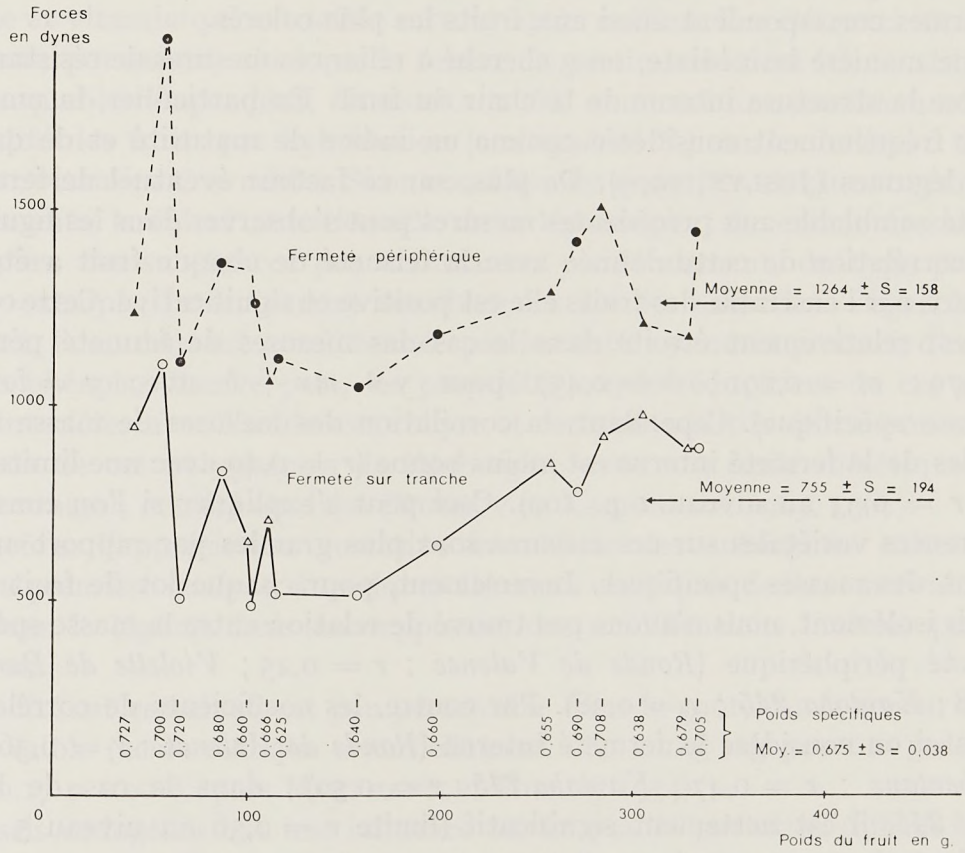


FIG 7. — *Mesures de fermeté des aubergines.*
Variété *Kantoba 245* (voir légende fig. 4).

à préciser. La détermination de la résistance à la pénétration d'un doigt mécanique avec des forces calibrées constitue une mesure objective directe de cette fermeté (fig. 5, 6, 7).

Tout d'abord, on observe que les différences variétales sont peu sensibles et les niveaux de fermeté voisins pour les deux types de mesures. La fermeté périphérique du fruit pelé est environ deux fois plus élevée que la fermeté sur les tranches. Ensuite, à partir des moyennes sur les trois variétés, on peut relever quelques tendances plus ou moins caractéristiques.

La *Ronde de Valence* apparaît légèrement plus résistante aux forces appliquées sur la périphérie, c'est-à-dire perpendiculaires à l'axe du fruit ; la forme sphérique et la structure fibreuse du mésocarpe, même sans pellicule cellulosique de l'épiderme, en sont vraisemblablement une cause importante.

La *Kantoba 245* présente la meilleure fermeté interne (moyenne = 755 dynes) surtout par rapport à la *Violette de Barbentane* (moyenne = 607 dynes) ; cette dernière est la moins résistante sous tous les angles. Entre ces deux variétés, la différence de fermeté (148 dynes) est significative.

En effet, malgré la variabilité des fruits, l'erreur standard de la différence étant de 63,6, l'écart entre les deux lots s'exprime sous la forme : $t = 2{,}325$ significatif au niveau 5 p. 100 pour $t = 2{,}05$ avec 32 degrés de liberté (LAMOTTE, 1957).

Indépendamment de la variété et compte tenu de la variabilité des mesures, l'influence de la période de cueillette n'apparaît pas ; de même, la maturité des fruits a un rôle peu sensible. Néanmoins, les individus les plus petits ou les plus gros sont identiques ou apparaissent légèrement plus fermes que les fruits moyens ; la fermeté n'est pas en relation avec le poids. Par contre, il semble que les fruits les moins fermes correspondent aussi aux fruits les plus colorés.

D'une manière immédiate, on a cherché à relier ces mesures de résistance mécanique avec la structure interne de la chair du fruit. En particulier, la masse spécifique est fréquemment considérée comme un indice de maturité et de qualité des fruits et légumes (JOSLYN, 1970). De plus, sur ce facteur éventuel de fermeté, une variabilité semblable aux précédentes mesures peut s'observer dans les figures 5, 6,7.

La corrélation de cette donnée avec la fermeté de chaque fruit a été étudiée. D'une part, sur l'ensemble des fruits elle est positive et significative. Cette corrélation linéaire est relativement étroite dans le cas des mesures de fermeté périphérique ($r = 0{,}979$; $m = 0{,}191$; $b = 0{,}457$ pour $y = mx + b$ avec y = fermeté et x = masse spécifique). Cependant, la corrélation des mesures de masse spécifique avec celles de la fermeté interne est moins bonne ($r = 0{,}40$ avec une limite de signification $r = 0{,}33$ au niveau 1 p. 100). Ceci peut s'expliquer si l'on considère que les différences variétales sur ces mesures sont plus grandes par rapport aux faibles variations des masses spécifiques. Inversement, pour chaque lot de fruit du même type, pris isolément, nous n'avons pas trouvé de relation entre la masse spécifique et la fermeté périphérique (*Ronde de Valence* : $r = 0{,}25$; *Violette de Barbentane* : $r = 0{,}08$; *Kantoba 245* : $r = 0{,}38$). Par contre, les coefficients de corrélation sont meilleurs si on considère la fermeté interne (*Ronde de Valence* : $r = 0{,}36$; *Violette de Barbentane* : $r = 0{,}47$; *Kantoba 245* : $r = 0{,}50$) ; dans le cas de la variété *Kantoba 245*, il est nettement significatif (limite $r = 0{,}36$ au niveau 5 p. 100 et $r = 0{,}46$ au niveau 1 p. 100).

Un élément important de la fermeté de la chair des fruits doit être l'impor-

tance pondérale relative et la solidité des parois cellulaires. En effet, la variété blanche *Kantoba 245* est la plus riche en cellulose et matières pectiques ; la teneur en protopectines est plus élevée comme le montre le tableau 1 de composition générale des aubergines. Ces quelques chiffres sont à rapprocher des confrontations semblables dans le cas des pêches *Pavies* destinées à la conserve (SOUTY *et al.*, 1967, 1969) ; la richesse en protopectines conditionne fortement la tenue du fruit avant et après cuisson. Nous avons là un éventuel facteur de qualité qui devrait être confirmé sur une expérimentation plus étendue dans le cas des aubergines.

Les pectines des fruits de *Solanum* d'origines diverses n'ont fait l'objet que de rares travaux sur leur pouvoir gélifiant et leurs teneurs en groupes méthylés (SCHARPENSEEL, 1957). L'indice d'estérification serait de 80 p. 100 ; de plus, on n'observe pas de relation entre la teneur en pectines et le poids des fruits (CORRAO, 1956). Ces études devraient être reprises sur les aubergines cultivées en France pour leur caractérisation et pour une meilleure maîtrise de leurs aptitudes technologiques.

C. — *Qualités alimentaires et gustatives*

L'aubergine ne peut être considérée comme un légume de valeur alimentaire importante. On n'observe pas de constituant d'intérêt majeur dans le tableau 1 de composition en éléments classiques rapportés.

Les nutritionnistes peuvent lui trouver un intérêt non négligeable de « support » dans des préparations supplémentées en aliments indispensables. La teneur relative en eau est forte, l'extrait sec est moyennement riche en glucides assimilables, la valeur protidique et vitaminique est faible surtout après cuisson. Les éléments alcalinisants (magnésium, potassium) ainsi que la teneur en pectines seraient les constituants les plus remarquables. Cependant, GIRINDRA (1966) a montré une sensible amélioration de la qualité des fruits par hybridation (croisements F_1) sur les indices : teneur en extrait sec, vitamine C et acides. Si on considère les quantités absolues consommables de ces éléments, la valeur nutritionnelle de ce légume peut devenir intéressante.

De plus, des substances peu abondantes pondéralement, du type polyphénolique par exemple, interviennent sensiblement sur les caractères organoleptiques. D'une part, la couleur est conditionnée par les anthocyanes et produits d'oxydation bruns des phénols, d'autre part, les propriétés oxydo-réductrices de ces composés peuvent interférer avec l'acide ascorbique et certains additifs de cuisson. Ainsi des interactions de ces polyphénols de l'aubergine avec une huile diététique, comme celle de tournesol, ont été étudiées (RUSKOV et KALICHKOV, 1965, 1967).

Toutefois, l'appréciation gustative immédiate des aubergines cuites peut se limiter, en première analyse, à quelques éléments classiques de flaveur évalués directement dans le légume frais en supposant des modifications limitées pendant la préparation.

L'acidité est certainement peu perceptible dans le goût, car la teneur en acides libres est faible (acide malique essentiellement : 80 à 115 mg par 100 g de matière fraîche ; 0,17 p. 100 d'après HARTMANN et HILLIG, 1934).

Les sels endogènes ont une influence sur la qualité gustative difficile à estimer, car les diverses préparations culinaires masquent ces constituants du goût.

Deux éléments sapides plus caractéristiques de ce légume sont, d'une part la

teneur en sucres, d'autre part celle en substances piquantes-amères mal définies et diversement appréciées par les consommateur.

Importance des sucres (tabl. 2).

Seule une petite fraction des glucides peut éventuellement se combiner avec les protides pour donner après chauffage les produits de la réaction de MAILLARD (composés bruns de cuisson du type mélanoïdines).

L'impression gustative est donc conditionnée par la quantité de sucres initiaux et par leur qualité ; on rappelle que les pouvoir sucrants du saccharose et du fructose sont supérieurs à celui du glucose.

La teneur des fruits frais en sucres est très variable selon l'état physiologique des individus au moment de la cueillette ; de même des conditions écologiques et culturales interviennent dans l'accumulation des glucides. Le tableau 2 permet de confronter, d'une part, des individus de grosseurs différentes et, d'autre part, des lots de cueillettes distinctes.

La *Ronde de Valence* est la plus sucrée sur les moyennes de l'année 1969, en accord avec l'opinion fréquente des consommateurs en faveur de ce fruit.

En 1970, une cueillette très précoce aboutit à des teneurs en sucres relativement faibles. Un lot de petits fruits, contenant 1,8 g de sucres totaux p. 100 g de matière fraîche, indique une maturité insuffisante. Une récolte prématurée peut donc être

TABLEAU 2

Glucides des aubergines

Sucres en g pour 100 g de matière fraîche	*Violette de Barbentane*			*Kantoba 245*			*Ronde de Valence*		
A) Mesures individuelles en fonction de l'état de maturité sur le critère poids du fruit (même récolte fin août 1969) (en g)	73	147	313	42	140	323	103	178	283
Sucres totaux	3,25	3,44	3,38	3,30	3,20	3,06	5,08	4,32	4,20
Sucres réducteurs	2,82	3,16	2,75	2,84	2,94	2,75	4,42	3,20	3,65
Différence	0,43	0,28	0,63	0,46	0,26	0,31	0,66	1,12	0,55
B) Mesures sur lots homogènes en fonction du poids moyen des fruits (récoltes 1969 ou 1970) (en g)	180 Sept. 69	250 Juil. 70		150 Sept. 69	200 Juil. 70		200 Sept. 69	150 Juil. 70	
Sucres totaux	3,12	2,5		3,44	2,8		4,22	2,8	
Sucres réducteurs	2,90	—		3,07	—		3,42	—	
Différence	0,22	—		0,37	—		0,80	—	
Saccharose	0,15	0,21		0,28	0,22		0,30	0,15	
Fructose	1,35	0,93		1,19	1,20		1,78	1,15	
Glucose	1,27	1,18		1,81	1,30		2,05	1,25	
$\frac{\text{Fructose}}{\text{Glucose}}$ p. 100	106	78		65	93		87	92	

défavorable à la qualité gustative ; les aubergines cueillies trop mûres apparaîtront aussi moins sucrées. Toutefois, compte tenu de la variabilité des fruits, les écarts paraissent peu sensibles entre les fruits d'un même lot mais de poids différents ; par contre, la teneur en sucres varie nettement avec la période de cueillette ou l'année de récolte.

Une relation entre les teneurs en sucres et anthocyanes de l'aubergine peut être envisagée conformément à une observation générale relevée sur d'autres fruits (Ulrich, 1952). Dans le cas de ce légume, elle n'est pas évidente ; la concentration en sucres varie peu avec la grosseur du fruit, du moins en valeur relative, à l'inverse de la couleur. Toutefois, on peut noter un certain parallélisme entre la quantité globale de sucres et celle des pigments rouges de chaque fruit, en fonction du poids des individus d'un même lot, cueillis avant surmaturation et perte de couleur.

D'après les quelques mesures faites, les variétés *Violette de Barbentane* et *Kantoba 245* ont des teneurs en sucres plus constantes d'un lot à l'autre. Pratiquement, la variété *Violette de Barbentane* peut être récoltée sur une période plus étalée que la *Ronde de Valence*, observation déjà faite pour la couleur. Ces données sur les critères de qualité, teneur en sucres et couleur, restent cependant à confirmer par une expérimentation plus systématique.

Identification de substances typiques de l'aubergine.

La présence de solanine dans l'aubergine est généralement admise (Kretovich, 1966). Cette substance, très amère, serait localisée dans la plante et l'épiderme des fruits (Tukalo, 1964), plus particulièrement dans les feuilles et les graines (Zyabko et Kobets, 1964). Toutefois, d'après ces derniers auteurs, la solanine des aubergines serait différente de celle d'autres sources, pomme de terre par exemple, car elle ne peut être isolée par la technique classique de séparation dans l'alcool acétique et précipitation en milieu fortement ammoniacal.

En appliquant rigoureusement le mode opératoire habituel (Cromwell, 1955) sur un extrait de 3 kg de fruit frais de chaque variété, *Violette de Barbentane* ou *Ronde de Valence*, nous n'avons pu isoler de solanidine cristalisée brute, ou un alcaloïde du même type.

Néanmoins, le test par la formaldéhyde, en milieu fortement acide, révèle une teneur appréciable en alcaloïde dans l'extrait initial. Toutefois, le goût amer primaire n'est pas très prononcé. Par contre, on discerne sur une coupe du fruit frais une substance piquante et brûlante localisée particulièrement autour des graines. De plus, les fruits à chair la plus verte apparaissent les plus typiques sur le plan goût ; cet examen organoleptique est fait après cuisson en boîte pendant 15 minutes à 110°C, en présence d'une saumure à 2 p. 100 de chlorure de sodium.

Divers essais d'isolement de ces substances non identifiées permettent quelques observations.

Le principe « piquant » apparaît plus soluble dans l'alcool et l'eau que dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le benzène et l'éther sulfurique. Ces solvants ont permis une purification sommaire, par élimination des chlorophylles et polyphénols, qui conduit à une liqueur brunâtre de goût piquant-amer prononcé. Une fraction isolée dans du butanol donne un produit brun solide déliquescent, dont le spectre IR, compatible avec des liaisons C=O, N—H et C—N, ne permet aucune identification.

L'ensemble des données précédentes conduit à penser que l'aubergine renferme

un glycoalcaloïde, voisin des solanidines, mais dont la structure n'a pu être précisée dans ces recherches.

On sait que les Solanées contiennent d'autres stéroïdes naturels, par exemple du type solasonine, solanocapsine ou tomatine. On peut supposer aussi une concentration trop faible en alcaloïde pour un isolement quantitatif. Une autre hypothèse repose sur la présence d'un autre type de substance sapide. Un composé à fonction amide retrouvée dans la capsaïcine ou la pipérine pourrait expliquer le goût piquant. Rappelons que la saveur amère, avant ou après cuisson d'un aliment, est aussi attribuée à des formes hétérocycliques azotées d'origines diverses.

D'autre part, les alcaloïdes ne sont que partiellement dégradés par le chauffage ; ainsi la cuisson, à l'eau ou à l'huile, des pommes de terre n'élimine qu'en partie la solanine (Zobel et Schilling, 1964).

Les propriétés physiologiques de ces composés stéroïdes des Solanées d'origines diverses ont fait l'objet de très nombreuses études relativement récentes par des pharmacologues et médecins. Les hygiénistes nous préciseront, dans l'avenir, si la teneur en alcaloïde de ce légume est souhaitable ou non.

On se préoccupe actuellement du passage du caractère « teneur en glycoalcaloïde » dans le croisement d'espèces *Solanum incanum* et *Solanum melongena* (Zutschi, 1966). Ces substances ont une grande importance dans la physiologie de la plante et sa résistance aux altérations microbiologiques ; elles peuvent fournir éventuellement une source de stéroïdes naturels.

L'étude des différences variétales est envisageable en utilisant des indices d'évaluation de ces alcaloïdes ; mais une première sélection peut déjà être faite en vérifiant la corrélation avec la teneur en chlorophylles. En effet, les variétés à chair blanche, *Kantoba 245* et les croisements intermédiaires, contenant peu de chlorophylles, ont une saveur plus neutre avant et après cuisson. Par contre, *Ronde de Valence*, très riche en chlorophylles, a une saveur très prononcée pouvant devenir assez désagréable. Cette caractéristique peut être diversement appréciée par le consommateur et surtout l'industriel en « plats cuisinés » qui écartent la saveur trop prédominante de ce légume ou la recherchent pour d'autres types de préparation. On peut déjà avancer que le facteur « attrait gustatif » sera une donnée non négligeable d'appréciation de la qualité des aubergines.

CONCLUSIONS

L'étude comparative des aubergines : *Violette de Barbentane* et *Ronde de Valence*, typiques des régions méridionales françaises, et de la *Kantoba 245* dont le fruit de couleur blanche est apparenté aux variétés d'origine orientale, a permis de mettre en relief plusieurs facteurs de qualité sur lesquels on peut agir.

Tout d'abord, l'intensité de couleur de la peau et de la chair du fruit peut être modifiée en intervenant par voie génétique sur les teneurs respectives en anthocyanes de l'épiderme et chlorophylles du mésocarpe. Par contre, les différences variétales de teinte pourpre violacée reposent sur des substituants différents, glucidiques et acylés, d'un aglycone unique : le delphinidol. Ceci permet de prévoir une instabilité

particulière de ce type de pigment au cours d'un traitement technologique, dans la stérilisation en conserve par exemple. La couleur blanche de la nouvelle variété *Kantoba 245* permettrait de pallier cet inconvénient ; mais une réserve s'impose, car les anthocyanes ne sont pas les seuls substrats oxydables et un brunissement de la chair dû à la présence d'acides-phénols est prévisible quelle que soit la variété.

Ensuite, la tenue du fruit dans sa manipulation, sa conservation, sa préparation culinaire, sera fonction de facteurs physiques, masse spécifique par exemple, liés à la teneur en matières cellulosiques et pectiques des parois cellulaires. On note une forte teneur en protopectines et peu de pectines solubles dans l'eau sur les fruits frais. La fermeté singulière de la *Kantoba 245* devrait intéresser l'utilisateur industriel pour la mise en conserve ; mais le goût neutre de cette variété peut être diversement apprécié selon le mode de préparation culinaire et suivant le consommateur.

La qualité gustative et nutritionnelle des aubergines dépend, en grande partie, de la richesse en sucres et en composés sapides « amers-piquants » non identifiés dans ce travail. La présence de glycoalcaloïdes stéroïdes, spécifiques des Solanées, est probable dans les parties vertes du fruit. Ainsi, la variété *Ronde de Valence* apparaît très typée par son goût accentué et sa richesse relative en chlorophylles.

Toutefois, les conditions écologiques peuvent avoir une influence aussi grande que les caractéristiques variétales sur la constitution de ce légume-fruit, par exemple sur la teneur en glucides.

De plus, une meilleure adaptation de la production à la destination des aubergines, en particulier selon le mode de conservation plus ou moins prolongé du fruit frais ou transformé, est souhaitable dans la sélection des variétés anciennes ou récentes. Les techniques analytiques proposées permettent des mesures objectives relativement simples pour contrôler la valeur de nouvelles créations.

Reçu pour publication en juillet 1971.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en collaboration avec la Station d'Amélioration des Plantes, Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A., 84 - Montfavet. Nous remercions plus particulièrement M. Pochard pour ses précieux conseils dans l'orientation de cette étude et pour la fourniture d'un matériel végétal sélectionné.

La Station d'Agronomie, Centre de Recherches d'Avignon, I.N.R.A., 84 - Montfavet, nous a aidé par son laboratoire spécialisé dans le dosage des substances minérales.

SUMMARY

THE EGG-PLANT (*SOLANUM MELONGENA* L.)

I. — COMPOSITION AND QUALITY FACTORS

A better knowledge of the composition and characteristics of some egg-plant varieties of the french meridional regions should permit the orientation of research on exploitation of this vegetable-fruit.

The colour of the fresh fruit comes from the anthocyanic pigments, delphinidol heterosides,

epicarp and mesocarp chlorophyla ; these constituants may be modified independently and within certain limits in the creation of new varieties.

Firmness and preservation aptitude are in terms of the physical cohesion (specific mass and shape of the fruit) and the chemical composition of the cell walls (pectic and cellulosic substances).

The taste of the cooked vegetable and its alimentary quality will be conditioned, to a high degree, by the sugar content and sapid compounds characteristic of the egg-plant. Identification tests of an alkaloid related to solanine are approached.

The new white and pale purple varieties with white pulp are singularized by their particular firmness and a more neutral taste favourable to industrial culinary preparations.

RESUMEN

LA BERENJENA (*SOLANUM MELONGENA* L.)
I. — COMPOSICIÓN Y FACTORES DE CALIDAD

Un mejor conocimiento de la composición y de las características de algunas variedades de berenjenas de las regiones meriodionales francesas debe permitir orientar las investigaciones acerca del cultivo de este fruto.

El color del fruto fresco procede de los pigmentos antociánicos, heterosides del delfinidol, del epicarpo y de las clorofilas del mesocarpo. Estos componentes pueden quedar modificados independientemente y entre ciertos límites en la creación de nuevas variedades.

La dureza y la aptitud para la conservación guardan relación con la cohesión física (peso específico y forma del fruto) y de la composición química de las paredes celulares (materias pécticas y celulósicas).

El sabor de este fruto una vez cocido y sus cualidades alimenticias dependen, en gran parte, del contenido del fruto fresco en azúcares y en componentes sapidos típicos de la berenjena. Se entra en materia respecto a los ensayos de identificación de un alcaloide próximo de la solanina.

Las nuevas variedades de color blanco o púrpura claro y de pulpa blanca se destacan por su dureza particular y un gusto más neutro, favorable para ciertas preparaciones culinarias industriales.

RIASSUNTO

LA MELANZANA (*SOLANUM MELONGENA* L.)
I. — COMPOSIZIONE E FATTORI DI QUALITÀ

Una migliore conoscenza della composizione e delle caratteristiche di alcune varietà di melanzana delle regioni meridionali francesi, deve permettere di orientare le ricerche per la coltura di questo ortaggio-frutto.

Il colore del frutto fresco è dovuto ai pigmenti antocianici, eterosidi del delfinidol, dell'epicarpo e della clorofilla del mesocarpo ; questi costituenti si possono modificare indipendentemente gli uni dagli altri ed entro certi limiti per la creazione di nuove varietà.

La durezza e la possibilità di conservazione dipendono dalla coesione fisica (massa specifica e forma del frutto) e dalla composizione chimica delle pareti cellulari (materia pettiche e cellulosiche).

Il sapore dell'ortaggio cotto e la sua qualità alimentare saranno condizionate, per la maggior parte, al tenore in zucchero del frutto fresco e al tenore in composti sapidi tipici della melanzana. Vengono intraprese delle prove per identificare un alcaloide che si avvicina alla solanina.

Le nuove varietà di color bianco o porpora chiaro e con polpa bianca si contraddistinguono per la loro particolare durezza e un gusto più neutro, favorevoli per delle preparazioni culinarie industriali.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe Y., Gotoh K., 1957. *Nation. Inst. Genet., Jap., Annu. Rep.*, **50**, 1959, *Bot. Mag.*, **72**, 432. Cité par J.-B. Harborne, 1962.

Casoli U., Dall'Aglio G., 1969. Ricerche sugli antociani di melanzana. *Industr. Conserve*, **44** (1), 18-20.

CAUSERET J., 1960. *La valeur alimentaire et thérapeutique des fruits et légumes (tableau de composition des fruits et légumes)*, n° spécial (31) (projet 7/10-*c*), 117-131. Agence européenne de Productivité. Organisation européenne de Coopération économique, Paris.

CORRAO A., 1956. Ricerche sul contenuto pectico dei frutti di *Solanum melongena* L. *Ann. Sper. agrar.*, **10**, 269-274 (in *Chem. Abstr.*, **52** (4), 3192 *e*).

CROMWELL B. T., 1955. The alkaloïds. in PEACH K., TRACEY M. V. *Modern methods of plant analysis*, vol. 3, 476-480, Springer Verlag, Berlin.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963. Sur l'extraction des composés polyphénoliques des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 287-312.

FILIPPOVA R. I., BELOWA Z. P., 1962. Biochemistry of egg plant. Biokhim. Kul't Rast. Zkad. Nauk Moldavsk. Nauckn. Issled. Inst. *Oroshaemogo Zemled. i Ovoshchevodska*, **3**, 104-125. (in *Chem. Abstr.*, **61**, 11002 *h*).

FLANZY M., AUBERT S., 1968. Méthode de purification de l'ensemble des composés phénoliques du vin. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 93-98.

Food Industries Manual, 1958. 948, Chemical Publishing Cy, Inc., New York.

FORTE V., 1966. *La melanzana*. Universale edagricole (28), Ed. agric., Bologna.

GIRINDRA M. M., 1966. Preliminary chemical studies in four varieties of brinjal (*Solanum melongena*) and their F_1 hybrids. *Sci. Cult.*, Calcutta, **32** (11), 545-546. (in *Chem. Abstr.*, **66**, 92410 *x*).

HARBORNE J. B., 1958. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.*, **70**, 22-28.

HARBORNE J. B., 1962. Chemicogenetical studies of flavonoïd pigments. In GEISSMAN, *The chemistry of flavonoid compounds*, 593-617, Pergamon Press, New York.

HARBORNE J. B., 1964. *Biochemistry of phenolic compounds*. Academic Press, New York.

HARBORNE J. B., 1965. in GOODWIN T. W., *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Academic Press, New York.

HARTMANN, HILLIG, 1934. Cité par JOSLYN, 1970. in *Methods of food analysis*, 409, Academic Press, New York.

J. Ass. off. anal. Chem., 1960. Cité par RIBÉREAU-GAYON P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*, 52, Dunod, Paris.

JOSLYN M. A., 1970. *Methods in food analysis*, 201-228, Academic Press, New York.

KRETOVICH V. L., 1966. *Principles of plant biochemistry*, 154, Pergamon Press, London.

KURODA C., WADA M., 1933. *Proc. imp. Acad.*, **9**, 51 ; 1935, **11**, 235. Cités par K. HAYASHI, 1962. The anthocyanins. in GEISSMAN, *The chemistry of flavonoid compounds*, 248-285, Pergamon Press, New York.

LAMORT C., 1958. Chromatographie, spectres d'absorption et dégradation d'anthocyanines de fruits. *Rev. Ferment. Industr. alim.*, **13** (4), 153-157.

LAMOTTE M., 1957. *Initiation aux méthodes statistiques en biologie*. Masson et Cie, Paris.

MAC KINNEY G., LITTLE A. G., 1962. *Color of foods*. The AVI Publishing Cy, inc., Westport, Connecticut.

NAGASHIMA Y., TAIRA T., 1965. On the pigments of egg plant. *Eiyo to skokuryo*, **17** (6), 420-422, (in *Chem. Abstr.*, **64**, 10086 *c*).

NYBON N., 1964. Thin-layer chromatographic analysis of anthocyanidins. *Physiol. Plant.*, **17**, 157-164.

O. C. D. E. (Organisation de Coopération et de Développement économiques), 1967. *Production de fruits et légumes dans les pays de l'O. C. D. E. Situation actuelle et perspectives 1970*, **17**, France, Belgique, Luxembourg. O. C. D. E., Paris.

O. E. C. E. (Organisation européenne de Coopération économique), 1960. *La consommation des fruits et légumes dans les pays de l'O. E. C. E.* Documentation, Alimentation et Agriculture, Projet n° 372-2, 213. Agence européenne de Productivité O. E. C. E., Paris.

OURNAC A., 1965. Étude du dosage de l'acide ascorbique dans les vins et les jus fortement colorés. *Ann. Technol. agric.*, **14** (4), 341-347.

OURNAC A., 1966. Corps interférant dans le dosage de l'acide ascorbique par la dinitrophénylhydrazine dans les jus de raisin et les vins. *Ann. Technol. agric.*, **15** (1), 113-125.

PIFFERI P. G., ZAMORANI A., 1969. Natural pigments. VI. Anthocyanins of *Solanum melongena*. *Industr. agric.*, **7** (2), 51-56.

POCHARD E., 1964. *Rapport annuel de la Station d'Amélioration des Plantes maraîchères*, 13-17. Institut national de la Recherche agronomique, 84 - Montfavet.

POCHARD E., 1965. *Rapport annuel de la Station d'Amélioration des Plantes maraîchères* 11-14. Institut national de la Recherche agronomique, 84 - Montfavet.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. II. Les acides phénols. *Ann. Physiol. vég.*, **6** (3), 119-139.

RIBÉREAU-GAYON P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris

RUSKOV P., KALICHKOV M., 1965. Influence of raw materials and steam on frying egg plant in sunflower oil (en bulgare). *Nauchni Tr. Vissh. Inst. Khranitelna. Vkusova Prom.*, **12** (1), 135-141. (in *Chem. Abstr.*, **64**, 14873 *d*).

RUSKOV P., KALICHKOV M., 1967. Changes in refined and crude sunflower oil during the frying of egg plant (en bulgare). *Nauchni. Tr., Vissh. Inst. Kranitelna. Wkusova Prom.*, **14** (1), 77-82.

SAKAMURA S., WATANABE S., OBATA Y., 1963. The structure of major anthocyanin in egg plant. *Agric. biol. Chem.*, **27** (9), 663-665 ; 1965, **29**, 181 ; 1966, **30** (4), 420-422.

SCHARPENSEEL H. W., 1957. Über Pectingehalt und Qualität tropischer Pflanzen-materialen. *Landw. Forsch.*, **10** (3), 191-194. (in *Chem. Abstr.*, **52** (8), 6662 *c*).

SÉMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Falsif. Fraudes*, **19**, 208-226.

SOUTY M., PERRET A., ANDRÉ P., 1967. Premières observations sur quelques variétés de pêches destinées à la conserve. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 55-68.

SOUTY M., VLADIMIROV G., FERRY P., 1969. Sur la fermeté des oreillons de quelques variétés de pêches appertisées au sirop. Rôle de certains constituants des fruits. *Pomol. fr.*, **11** (3), 81-88.

SUMERE VAN C. F., WOLF G., TEUCHY H., KINT J., 1965. A new thin-layer method for phenolic substances and coumarins. *J. Chromatogr.*, **20**, 48-60.

TANCHEV S. S., RUSKOV P. J., TIMBERLAKE C. F., 1970. The anthocyanins of bulgarian aubergine (*Solanum melongena*). *Phytochemistry*, **9**, 1681-1682.

TIGCHELAAR E. C., JANICK J., ERICKSON H. T., 1968. The genetics of anthocyanin coloration in egg plant (*Solanum melongena* L.). *Genetics*, **60**, 475-491.

TUKALO E. A., 1964. Investigation of different varieties of the solanaceae family for the presence of compounds with steroid structure (en russe). *Izuch i Ispol'z Lekarstv. Rastit. Resursov S. S. S. R.*, 288-290. (in *Chem. Abstr.*, **62**, 10821 *d*).

ULRICH R., 1952. *La vie des fruits*, 256-258, Masson et Cie, Paris.

WATANABE S., SAKAMURA S., OBATA Y., 1966. Structure of acylated anthocyanins in egg plant and perilla, and the position of acylation. *Agric. biol. Chem.*, **30** (4), 420-422 (in *Chem. Abstr.*, **65**, 2621 *h*).

WINTERMANS J. F., DE MOTS A., 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. *Biochim. biophys. Acta*, **109**, 448-453.

ZUTSHI U., 1966. The transference of solasodine from *Solanum incanum* to *Solanum melongena*. *Curr. Sci.*, **35** (17), 439. (in *Chem. Abstr.*, **65**, 15803 *b*).

ZOBEL M., SCHILLING J., 1964. Behavior of solanine in potatoes with various preparation methods. *Z. Lebensmittel. Unters. u. Forsch.*, **124** (5), 327-33. (in *Chem. Abstr.*, **61**, 9961 *g*).

ZYABKO L. P., KOBETS B. M., 1964. Solanine content of egg plant in the dynamic of growth and development. *Izv. Vysshikh uchebn. Zavedenii, Phischevaya Tecknol.*, **1**, 26-28 (en russe). (in *Chem. Abstr.*, **61**, 3416 *c*).

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (3), 265-278.

NOTE TECHNIQUE

SUR L'UTILISATION D'UN COMPTEUR ÉLECTRONIQUE DE PARTICULES EN MYCOLOGIE CÉRÉALIÈRE (1)

Jeanne POISSON et B. CAHAGNIER

Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés, I. N. R. A., Section Microbiologie, 16, rue Nicolas-Fortin, 75 - Paris

RÉSUMÉ

Dans cette note sont présentés des exemples d'applications nouvelles d'un compteur électronique de particules dans le domaine de la mycologie céréalière :

— détermination de paramètres permettant d'évaluer le potentiel d'expansion et l'état physiologique d'une population conidienne : importance numérique, indice de gonflement, pouvoir germinatif et taux de survie ;

— détermination des courbes de distribution de tailles des conidies des moisissures dominantes du maïs ;

— évaluation rapide du développement de la mycoflore des grains en cours de stockage.

Mots clés : *céréales, mycologie, compteur Coulter.*

INTRODUCTION

Pour des recherches sur la morphologie, l'écologie ou la physiologie des moisissures nécessitant le dénombrement ou la mesure du volume d'une grande quantité de conidies, il peut être intéressant d'utiliser un compteur électronique de particules qui permet, en quelques secondes, d'obtenir une réponse portant sur plusieurs milliers d'éléments. Cet appareil, dans bien des cas, est susceptible de remplacer avanta-

(1) Travail effectué avec l'aide financière du C.E.A., Département de Biologie, Service de Radioagronomie.

geusement le microscope optique, les turbidimètres, les tamisages et les procédés de mesure classiques de granulométrie.

Dans cette optique, le compteur Coulter a déjà été utilisé en microbiologie et notamment en mycologie pour étudier la taille des levures de brasserie (CLAVEAU *et al.*, 1968), la multiplication des levures dans le moût de raisin (LAFON-LAFOURCADE, 1968), la taille des spores de moisissures, l'action de la pression osmotique sur leur gonflement pendant la germination et l'action d'agents antifongiques (BARNES et PARKER, 1967, 1968).

Quelques exemples d'applications nouvelles du compteur Coulter sont relatés ci-après ; ils sont tirés d'études effectuées sur la mycoflore céréalière, dans le cadre de travaux relatifs à la conservation des céréales et à leurs traitements par des agents physiques (chaleur, froid, irradiation).

I. — MATÉRIEL UTILISÉ ET PRINCIPE DE L'APPAREIL

1.1. — *Préparations conidiennes*

Les souches de moisissures isolées à partir de céréales sont cultivées sur milieu nutritif gélosé — milieu Czapek gélosé ou milieu à base d'extrait de malt — ou sur des grains crus décontaminés.

Après 8 jours de culture, les conidiospores sont récoltées sur billes de verre ou sur grains de maïs crus dépoussiérés.

Pour le dénombrement et la mensuration au compteur Coulter, les conidies sont mises en suspension dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,9 p. 100 qui ne provoque pas leur déformation (BARNES et PARKER, 1967). Les suspensions sont homogénéisées par des ultra-sons à faible intensité, excepté les suspensions de spores à membrane diffluente (comme celles de certaines *Mucorales*) qui sont simplement agitées.

1.2. — *Le compteur de particules — Principe — Expression des résultats*

Le principe et le fonctionnement de l'appareil ont été décrits dans de nombreuses publications, aussi bien en France qu'à l'étranger (PONTIGNY, 1966) ; aussi nous bornerons-nous à rappeler, très brièvement, les données élémentaires nécessaires à la compréhension des travaux exposés.

Les particules à dénombrer et à mesurer sont mises en suspension dans un liquide électriquement conducteur. Un système d'aspiration fait circuler la suspension à travers un microorifice placé entre deux électrodes auxquelles est appliquée une tension continue. Le passage d'une particule dans l'orifice crée une variation d'intensité dans le circuit, variation transformée en une impulsion électrique dont l'amplitude est proportionnelle au volume de la particule.

Le domaine d'utilisation du compteur Coulter s'étend à des particules dont les dimensions, exprimées en diamètre de sphère équivalente, vont de 0,6 μ à plusieurs centaines de microns, les dénombrements pouvant être théoriquement effectués de 0,1 μ en 0,1 μ.

Dans le cas des essais mentionnés ici, on a utilisé les sondes de 70 μ et 100 μ, les diamètres minimaux mesurés étant respectivement de 1,28 μ et 1,6 μ.

Le nombre de particules de taille équivalente ou supérieure à une dimension de base est obtenu par lecture directe. Les dimensions des particules examinées sont calculées en volume ou en diamètre de sphère équivalente, à partir des données numériques de l'appareil.

Les résultats sont représentés graphiquement de diverses façons : les dimensions des tailles des particules au centre des classes peuvent être portées en abscisse et les comptages en nombre cumulés ou en nombres différentiels portés en ordonnée.

Mais pour pouvoir comparer les phénomènes observés au cours de différents essais, il est souvent préférable de porter en ordonnée les comptages cumulés p.100 de la population totale (fig. 1 *a*) ou le pourcentage des particules dénombrées dans une classe donnée, par rapport à l'ensemble de la population (fig. 1 *b*).

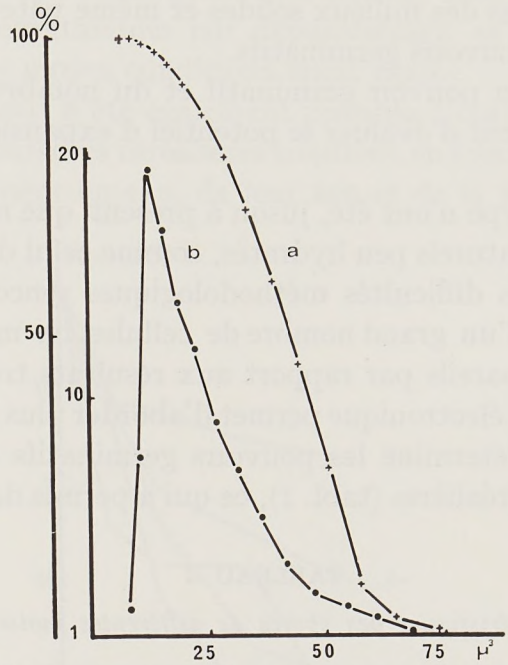


FIG. 1. — *Répartition des tailles des conidies de* P. notatum *en volume de sphère équivalente*
a : Courbe de fréquences cumulées relatives
b : Courbe de comptages différentiels en p. 100 de la population
abscisse : fréquence relative
ordonnée : volume de sphère équivalente en μ^3

II. — APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA MYCOFLORE CÉRÉALIÈRE

2.I. — *Cas de populations conidiennes isolées de leur substrat d'origine*

2.II. *Applications basées sur le dénombrement d'une population*

2.III. *Détermination du pouvoir germinatif d'une population de conidies*

Le pouvoir germinatif d'un lot de conidies peut être défini de façon analogue à celui des semences, par le rapport, multiplié par 100, du nombre d'éléments capables de germer ou de donner naissance à une colonie sur milieu de culture au nombre total d'individus.

Or, il est souvent utile de connaître la valeur du pouvoir germinatif d'un lot de conidies pour juger de son état physiologique.

C'est ainsi que les variations du pouvoir germinatif d'un lot de conidies soumis à des traitements divers, chimiques (antifongiques) ou physiques (dessiccation, chauffage, irradiation), permettent de suivre l'action de ces traitements.

Le rapport du pouvoir germinatif du lot traité au pouvoir germinatif du lot témoin est un mode d'expression simple, dont la valeur est une fonction inverse de l'efficacité du traitement; la valeur de ce rapport multipliée par 100 représente le taux de survie des conidies après traitement.

Le taux de survie est facile à déterminer lorsque les populations des échantillons témoins et traités sont identiques à l'origine (suspension microbienne homogène et partie aliquote de cette suspension, par exemple) ; il suffit alors de dénombrer les germes revivifiables du lot témoin et du lot traité. Mais ce procédé n'est plus utilisable si la population microbienne est inégalement répartie sur le substrat ce qui

est presque toujours le cas des milieux solides et même pâteux. Il faut alors recourir à la détermination des pouvoirs germinatifs.

Enfin, les valeurs du pouvoir germinatif et du nombre total des conidies sont des données qui permettent d'évaluer le potentiel d'expansion d'une espèce dans les conditions réalisées.

Des mesures de ce type n'ont été, jusqu'à présent, que rarement entreprises dans le domaine des milieux naturels peu hydratés, comme celui des céréales et des graines oléagineuses, à cause des difficultés méthodologiques rencontrées : dénombrement au microscope optique d'un grand nombre de cellules, ou mesures néphélométriques après étalonnage des appareils par rapport aux résultats trouvés par comptages au microscope. Le comptage électronique permet d'aborder plus facilement ces questions.

Ainsi, nous avons déterminé les pouvoirs germinatifs d'un certain nombre de souches de moisissures céréalières (tabl. I), ce qui a permis de mettre en évidence que

TABLEAU I

Caractéristiques des spores de différentes moisissures

Espèces	Pouvoir germinatif (8 jours) en p. 100	Taille des spores — Moyenne de classe — Abscisse du pic en μ	Taille des spores — Moyenne de classe — Abscisse du pic en μ³
Penicillium :		*	
P. cyclopium WEST	58	2,9	12,77
P. frequentans WEST	78	2,7	10,3
P. oxalicum WEST	63	3,1	15,56
P. expansum LINK	42	3,1	15,56
P. notatum WEST	64	2,9	12,77
Aspergillus :		*	
A. candidus LINK	64	2,9	12,77
A. flavus (2) LINK	53	3,7	26,50
A. versicolor TIRABOSCHI		3,1	15,56
A. niger VAN TIEGHEM		3,7	26,50
A. ochraceus WILHELM		3,1	15,56
Mucor pusillus LINDT		* 2,9	12,77
Cladosporium :		**	
C. sphaerospermum	26	3,4	20,45
C. cladosporioides DE VRIES	47	3	14,14
C. herbarum LINK		3,4	20,45
Verticillium sp.	52	** 2,1	4,8
Cephalosporium acremonium		** 2,1	4,8

* Dénombrement effectué de 0,2 μ en 0,2 μ

** Dénombrement effectué de telle sorte qu'il existe un rapport de $\sqrt[6]{2}$ entre les diamètres moyens de deux classes successives.

les pouvoirs germinatifs sont sensiblement les mêmes, dans les cas des cultures effectuées sur grains crus décontaminés par dépoussiérage, et sur milieu gélosé à base d'extrait de malt, toutes autres conditions étant égales.

De cette façon, il nous a été également possible d'établir des courbes de survie des conidiospores de moisissures céréalières irradiées, en fonction de la dose et du mode d'irradiation, de leur teneur en eau, de leur âge et de la température du chauffage

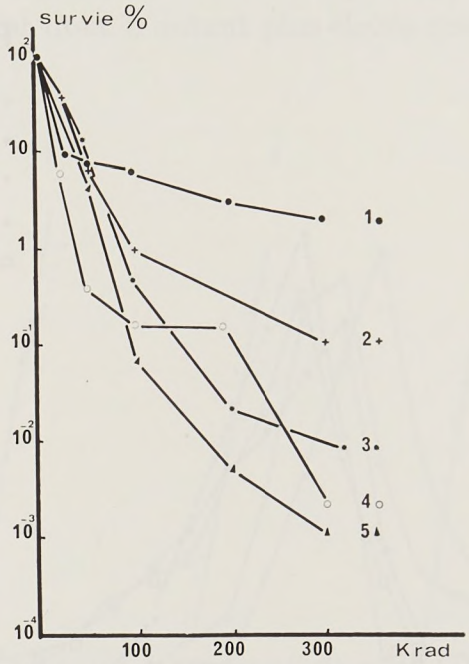


FIG. 2. — *Survie de populations conidiennes après irradiation gamma, en fonction de la dose exprimée en Krad*
1 : *Cladosporium cladosporioides* ; 2 : *Penicillium cyclopium* ; 3 : *Penicillium notatum* ; 4 : *Verticillium* sp.
5 : *Aspergillus flavus*

(POISSON *et al.*, 1963, 1965). Les courbes de survie sur grains de maïs, après irradiation gamma des conidiospores de souches de *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium cyclopium* et *notatum*, *Verticillium malthousei* et *Aspergillus flavus* son illustrées par la figure 2.

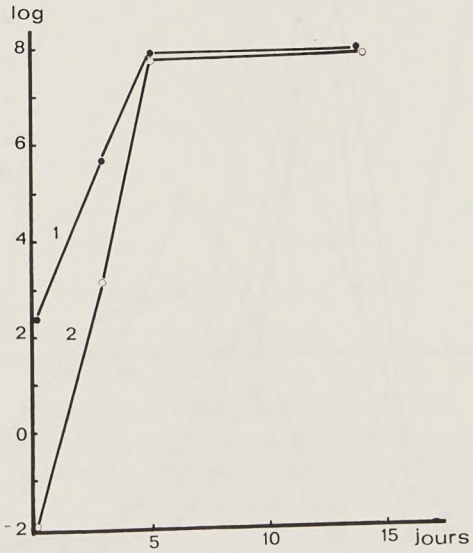


FIG. 3. — *Influence de l'importance de l'inoculum sur le taux de croissance*
abscisse : durée de l'essai en jours
ordonnée : logarithme du nombre de microorganismes par gramme de grains

2.112. *Préparation d'inoculum contenant une quantité déterminée de conidies*

Il est parfois nécessaire d'inoculer une quantité connue de conidies, par exemple pour déterminer l'influence d'un substrat sur la courbe de croissance d'une espèce donnée ou sur l'élaboration d'un métabolite, ou pour déterminer l'influence du peu-

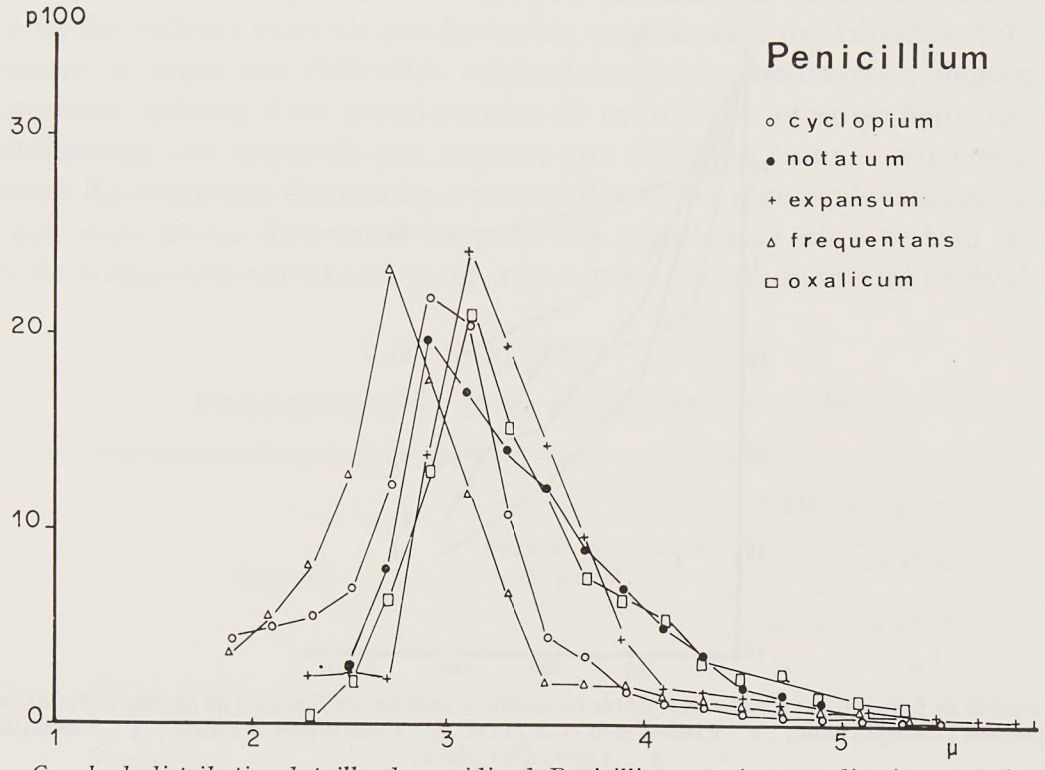


FIG. 4. — *Courbe de distribution de tailles des conidies de* Penicillium *exprimées en diamètre de sphère équivalente*

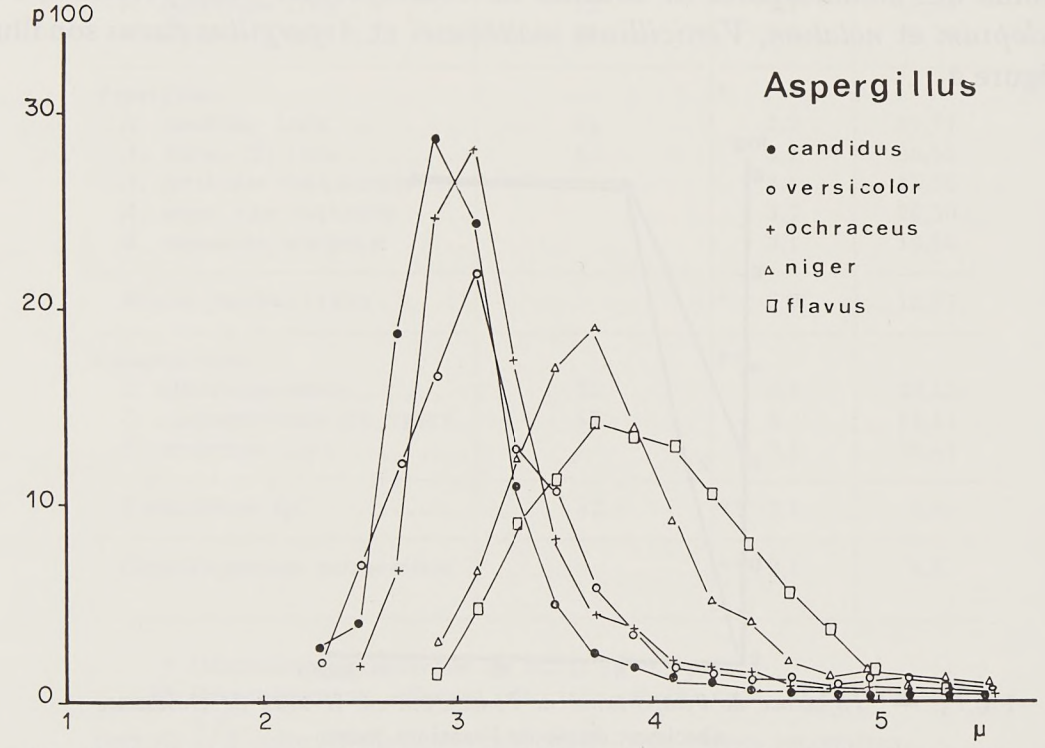


FIG. 5. — *Courbe de distribution de tailles des conidies d'*Aspergillus, *exprimées en diamètre de sphère équivalente*

plement initial des grains sur la vitesse de leur colonisation par l'espèce étudiée au cours du stockage.

C'est ainsi que des lots de grains de maïs sains, nettoyés par plusieurs rinçages à l'eau stérile, sont ensemencés avec moins de 3.10^{-2} et 240 conidies de *Penicillium chrysogenum* par gramme. Après 14 jours de stockage, en atmosphère ventilée à 22°C sous une humidité relative voisine de 90 p. 100, les populations des deux lots sont équivalentes dans les conditions de nos essais; la vitesse de colonisation du substrat par *P. chrysogenum* est donc d'autant plus élevée que l'inoculum initial est plus faible (fig. 3).

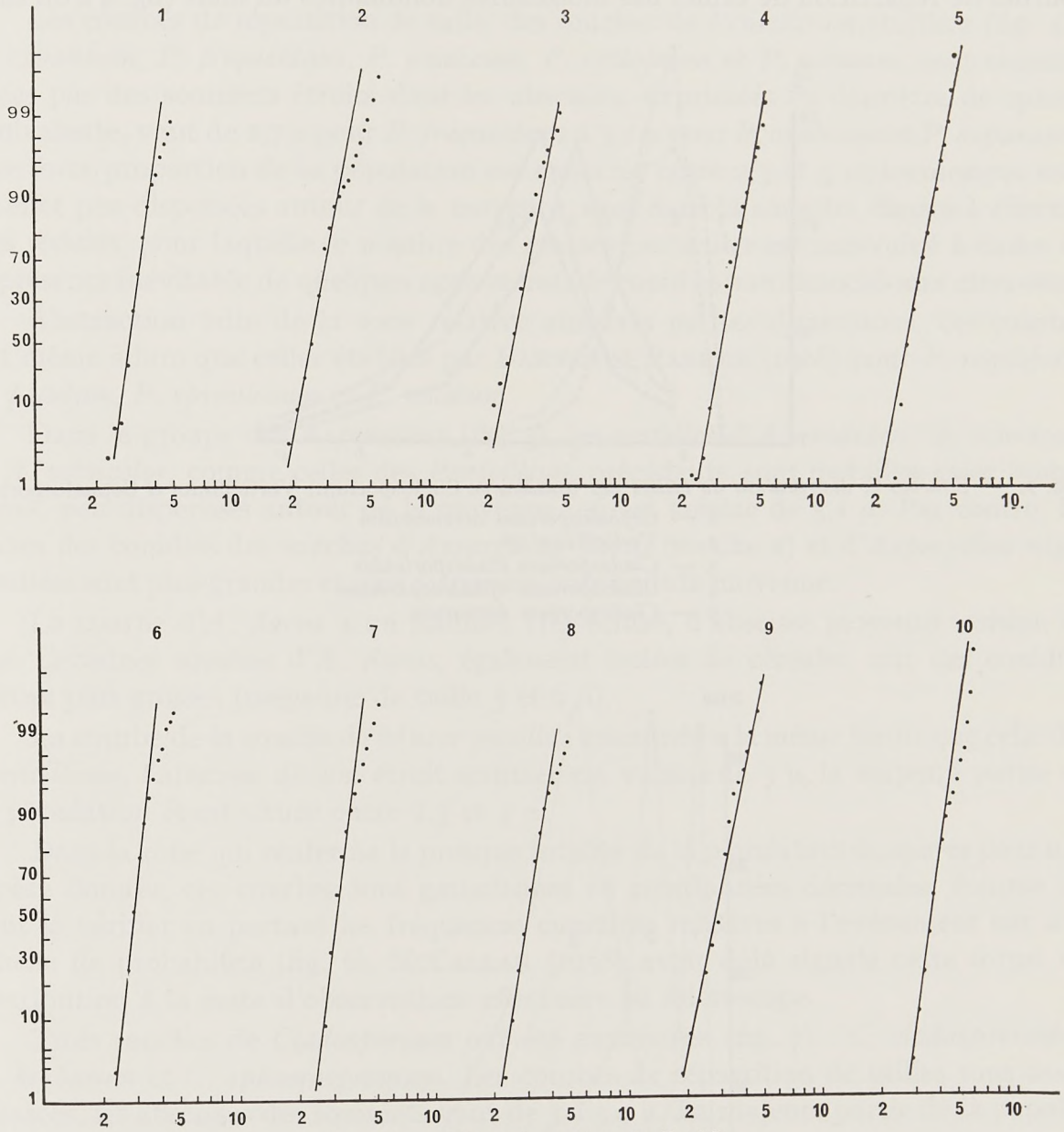


FIG. 6. — *Transformation de Probit*

abscisse : taille des conidies exprimée en diamètre de sphère équivalente ;
ordonnée : fréquences cumulées relatives

Penicillium : 1 — *P. expansum*
2 — *P. frequentans*
3 — *P. cyclopium*
4 — *P. oxalicum*
5 — *P. notatum*

Aspergillus : 6 — *A. candidus*
7 — *A. ochraceus*
8 — *A. versicolor*
9 — *A. flavus*
10 — *A. niger*

2.12. *Applications basées sur la distribution d'une population de conidiospores par classes de tailles*

2.121. *Courbe de répartition de tailles des spores des principales moisissures céréalières*

Le compteur électronique peut servir à établir rapidement la courbe de distribution de tailles d'une population conidienne, soit pour vérifier la pureté d'une souche, soit pour obtenir un renseignement d'ordre taxonomique par exemple, puisque l'abscisse du sommet de la courbe serait une constante pour certaines espèces (BARNES, 1968 ; MC CALLAN, 1958). C'est pourquoi il nous a paru intéressant de présenter les courbes de répartition de tailles des moisissures dominantes du maïs (fig. 4 à 8). Elles

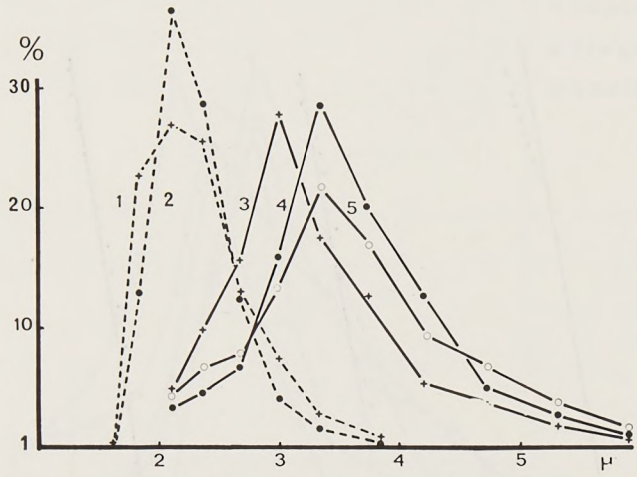


FIG. 7. — *Courbes de distribution de tailles des conidies de* Cladosporium, Verticillium *et* Cephalosporium

1 — *Cephalosporium acremonium*
2 — *Verticillium sp.*
3 — *Cladosporium cladosporioides*
4 — *Cladosporium sphaerospermum*
5 — *Cladosporium herbarum*

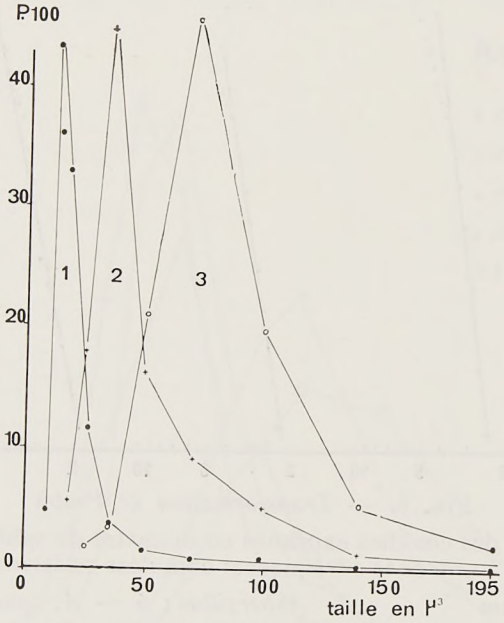


FIG. 8. — *Gonflement des conidies. Courbes de distribution de tailles des conidies de* Penicillium cyclopium

1 : au temps 0
2 : au temps 4 heures
3 : au temps 8 heures

ont été établies avec des spores provenant de moisissures cultivées pendant 8 jours sur extrait de malt gélosé. Les caractéristiques de ces courbes sont consignées dans le tableau 1. Dans certains cas, le dénombrement est réalisé de 0,2 μ en 0,2 μ (fig. 4, 5, 6) ; dans les autres cas, il est effectué de telle sorte qu'il y ait un rapport $\sqrt[6]{2}$ entre deux centres de classe successifs, ce qui, compte tenu des caractéristiques de l'appareil, permet de travailler de façon beaucoup plus rapide. Il est évident que seules des répartitions effectuées à partir des mêmes découpages sont comparables.

Le dénombrement des plus petites conidies est imprécis quand, pour une espèce, le continuum de variation des tailles est trop étendu (4 à 5 μ) ; de ce fait la valeur de l'ordonnée au sommet est approximative.

Les courbes de répartition de taille des souches de *Penicillium* étudiées (fig. 4) : *P. expansum*, *P. frequentans*, *P. oxalicum*, *P. cyclopium* et *P. notatum*, sont caractérisées par des sommets étroits dont les abscisses, exprimées en diamètre de sphère équivalente, vont de 2,7 μ pour *P. frequentans* à 3,1 μ pour *P. oxalicum* et *P. expansum*. Une forte proportion de la population est resserrée entre 2,3 et 5 μ ; les mesures sont en effet peu dispersées autour de la moyenne, sauf dans la zone des classes à effectifs très réduits, pour laquelle le nombre des grosses particules est surévalué à cause de la présence inévitable de quelques agglomérats de conidies non dissociés aux ultra-sons.

Abstraction faite de la zone relative aux très petites dimensions, ces courbes ont même allure que celles établies par Barnes et Parker (1968) pour *P. roqueforti*, *P. patulum*, *P. spinulosum* et *P. notatum*.

Dans le groupe des *Aspergillus* (fig. 5), les conidies d'*A. candidus*, *A. ochraceus* et *A. versicolor*, comme celles des *Penicillium* précédents, sont de tailles assez homogènes, peu dispersées autour de la moyenne qui est voisine de 3,1 μ. Par contre, les tailles des conidies des souches d'*Aspergillus flavus* (souche 2) et d'*Aspergillus niger* étudiées sont plus grandes et plus dispersées autour de la moyenne.

La courbe d'*A. flavus* a un sommet très écrasé, d'abscisse moyenne voisine de 4 μ. Certaines souches d'*A. flavus*, également isolées de céréales, ont des conidies encore plus grosses (moyenne de taille 5 et 6 μ).

La courbe de la souche de *Mucor pusillus* examinée a la même forme que celle des *Penicillium*, l'abscisse de son étroit sommet est voisine de 3 μ, la majeure partie de sa population étant située entre 2,3 et 4 μ.

Dans la zone qui renferme la presque totalité de la population de spores pour une espèce donnée, ces courbes sont gaussiennes en coordonnées décimales, comme on peut le vérifier en portant les fréquences cumulées relatives à l'événement sur une échelle de probabilité (fig. 6). McCallan (1958) avait déjà signalé cette forme de distribution à la suite d'observations effectuées au microscope.

Trois souches de *Cladosporium* ont été examinées (fig. 7) : *C. cladosporioides*, *C. herbarum* et *C. sphaerospermum*. Les courbes de répartition de tailles sont assez écrasées, les abscisses des sommets vont de 3 à 3,4 μ. La majeure partie de la population se trouve entre 2 μ et 5 μ.

Les spores de *Verticillium sp.* et de *Cephalosporium acremonium* isolées du maïs sont plus petites que celles des *Penicillium*. Les abscisses des sommets des courbes de répartition de tailles sont voisines de 2,1 μ (fig. 7). Les populations conidiennes de *Verticilium* sont pratiquement monodimensionnelles, ce que traduit l'étroitesse du pic. Elles peuvent servir à étalonner le compteur Coulter.

2.122. *Détermination du gonflement des conidies au cours de la germination*

Le gonflement des spores de moisissures est souvent considéré (BARNES, 1967) comme une phase du processus de germination.

Or, au cours du gonflement, la courbe de distribution de tailles d'une population de conidies est modifiée ; l'amplitude de cette modification peut, dans certains cas, être retenue pour évaluer la viabilité d'un lot de conidies.

La détermination du gonflement au compteur Coulter ne demande que quelques heures, alors que celle du pouvoir germinatif, d'après la méthode décrite ci-dessus, nécessite plusieurs jours à cause du dénombrement sur milieu de culture.

Nous avons suivi le gonflement, à 24°C, de conidies de *Penicillium cyclopium* dans une solution nutritive à base d'extrait de malt, stérilisée par filtration sur disque millipore 0,45 μ avant l'ensemencement.

Les courbes de distribution des tailles des conidies sont établies à 0-4 et 8 heures, soit avant l'émergence du tube mycélien qui apparaît en général 9 à 11 heures après la mise en culture, le temps de germination dans un milieu donné, à une température donnée, étant une caractéristique de l'espèce.

L'abscisse du sommet des courbes de distribution de tailles se déplace vers la droite pendant la période d'incubation, ce qui signifie que la proportion des spores de tailles élevées va en augmentant, donc qu'une fraction de la population initiale a gonflé et qu'elle est susceptible de germer (fig. 8). Dans l'exemple cité, au moins 80 p. 100 des spores gonflent.

Au cours de certains essais, s'il est nécessaire de comparer le gonflement de différents lots de spores, la valeur de l'abscisse au sommet des courbes de répartition peut être retenue comme indice de gonflement (BARNES, 1967). Lorsque la détermination du nombre de particules de petites tailles est obtenue avec une approximation suffisante, il est possible d'exprimer l'indice de gonflement de diverses façons : par la moyenne des tailles au temps considéré, par la surface des aires délimitées par les courbes de fréquences cumulées ou par le produit des coordonnées du sommet. Dans l'exemple donné ci-dessus, les abscisses des sommets, aux temps 0-4 et 8 heures, sont respectivement de 12,7-35,6 et 70,3 μ^3.

Si l'on choisit, comme indice de gonflement, le rapport de la valeur de l'abscisse au sommet au temps t à sa valeur au temps 0, on trouve au temps 4 heures un indice de 2,8 et au temps 8 heures un indice de 5,5. On pourrait également choisir le rapport des moyennes qui sont significativement différentes les unes des autres au seuil de probabilité 0,001.

2.2. — *Cas de la population fongique des grains; évolution au cours du stockage*

2.21. *Évaluation de la colonisation des grains par une espèce pure*

Soit un lot de maïs récolté à la main, partiellement décontaminé par un stockage à — 20°C, ensemencé après décongélation avec du *Penicillium expansum*, puis stocké à 22°C en atmosphère libre, sous une humidité relative supérieure à 95 p. 100.

L'importance de la population conidienne du lot est évaluée de deux façons : par la méthode classique des dilutions décimales et cultures en boîtes de Pétri, et par dénombrement électronique.

50 g de maïs sont introduits dans un ballon contenant 200 ml d'eau stérile, filtrée sur millipore 0,45 μ ; après 20 minutes d'agitation sur l'agitateur à secousses Prolabo

(vitesse 3), une partie du liquide surnageant est filtrée sur verre fritté n° 2 pour éliminer les grosses particules de diamètre supérieur à 90 μ qui rendraient le dénombrement impossible, puis homogénéisé au Potter. Une quantité connue de la suspension est diluée avec de l'eau stérile, exempte de particules supérieures à 0,45 μ, de telle sorte que le nombre total de particules comptées au compteur Coulter soit voisin de 10 000. Dans cet essai, le seuil à partir duquel le dénombrement est effectué est fixé à 2,4 μ. En effet, le seuil choisi dépend des mensurations des conidies de la variété de moisissure étudiée. La sonde utilisée est celle de 100 μ.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 9 (courbes 1) ; les courbes d'évolution du nombre de microorganismes sont très comparables, que le dénombrement soit effectué au compteur Coulter ou par la méthode habituelle des dilutions et de culture en boîtes de Pétri.

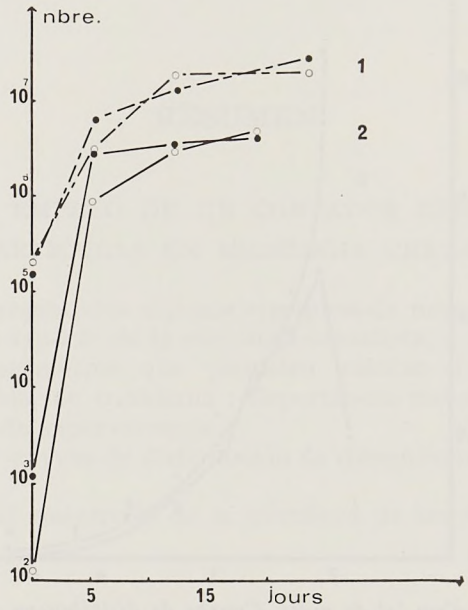


FIG. 9. — *Multiplication de la mycoflore de grains de maïs*

abscisse : durée de stockage en jours
ordonnée : nombre de microorganismes par gramme de grain
● dénombrements effectués avec le compteur électronique
o dénombrements effectués par la méthode de cultures en boîtes de Pétri
1 — culture pure de *Penicillium expansum* sur maïs
2 — mycoflore globale de maïs humide

2.22. *Appréciation de l'évolution quantitative de la flore fongique d'un lot de maïs*

Du maïs, récolté humide à la moissonneuse-batteuse, a été stocké tel quel en atmosphère libre à 22°C.

La population fongique des lots est évaluée comme précédemment, mais le seuil de numération est fixé à 1,7 μ pour que les levures et les spores de moisissures se trouvent dans la zone explorée par le compteur de particules.

Au début de l'essai, les dénombrements électroniques sont supérieurs à ceux qui sont effectués sur boîte de Pétri, à cause de la présence de particules non microbiennes et de cellules mortes. Mais, si la multiplication des levures et des moisissures est active la proportion des particules non revivifiables s'abaisse rapidement et les renseignements donnés par les deux méthodes sont du même ordre de grandeur (fig. 9, courbes 2). Ainsi, la numération électronique devrait permettre de surveiller la stabilité microbiologique d'un lot de grain puisqu'elle donne la possibilité d'obtenir une réponse rapide sur l'évolution de sa flore fongique.

2.23. *Composition de la mycoflore d'un lot de maïs*

Le continuum de variation des tailles des composantes de la microflore du maïs s'étend souvent sans interruption de quelques dixièmes de μ (petites bactéries) à près de 10 μ. Dans ces conditions, il n'est pas toujours possible, compte tenu des caractéristiques de l'appareil, d'obtenir la courbe de répartition des tailles des seuls éléments de la mycoflore.

La figure 10 *a* illustre le cas d'un lot de maïs, dont la mycoflore dominante est constituée par du *Verticillium*, ce que traduit l'abscisse du pic de la courbe de répartition (2,1 μ).

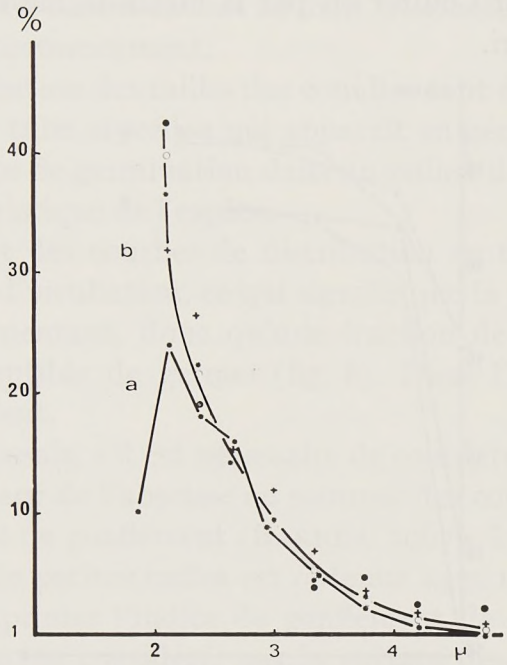


FIG. 10. — *Microflore fongique d'un lot de maïs. Courbe de distribution de tailles de ses composantes*
a : mycoflore à *Verticillium* dominant
b : cas général

On obtient plus fréquemment des courbes de répartition ayant même allure que celle de la figure 10 *b*, qui illustre le cas d'un maïs renfermant une population hétérogène de bactéries, de moisissures et de levures. Cette courbe, établie à partir de 4 échantillons provenant d'un même lot, indique qu'il y a des particules de tailles inférieures à 2,1 μ (exprimées en diamètre de sphère équivalente) et que les tailles des composantes de la flore s'étendent, sans interruption, de plus de 5 μ à moins de 2 μ.

III. — CONCLUSION

Ainsi qu'en témoignent les exemples présentés, qui sont empruntés à des essais effectués dans le cadre d'une étude de la conservation des céréales, un compteur de particules, comme le compteur Coulter, est susceptible d'avoir de multiples applications au cours de recherches en mycologie, qu'il s'agisse du dénombrement d'une population ou de l'évaluation de son potentiel d'expansion.

Reçu pour publication en juillet 1971.

SUMMARY

USE OF A PARTICLES COUNTER IN THE FIELD OF CEREAL MYCOLOGY

This paper describes some examples of new applications of an electronic particles counter used in the field of cereal mycology.

This process enables us :

1. To determine the parameters to evaluate the capacity of expansion and the physiological state of a conidial population (its numerical, its swelling coefficient, its germination capacity, and its survival rate).
2. To determine also the size distribution of the conidies of the corn main moulds.
3. Endly, to evaluate rapidly the increase in the number of fungi during the storage.

RESUMEN

ACERCA DEL EMPLEO DE UN CONTADOR ELECTRONICO DE PARTICULAS EN MICOLOGIA CEREALISTA

En este reseña figuran presentados algunos ejemplos de nevas aplicaciones de un contador electrónico de partículas en el aspecto de la micología cerealista, a saber :

— Determinación de parámetros que permiten valorar el potencial de expansión y el estado fisiológico de una población conidiana : importancia numérica, índice de hinchamiento, poder germinativo y relación de supervivencia.

— Determinación de las curvas de distribución de dimensiones de las conidias de los mohos dominantes del maíz.

— Evaluación rápida del desarrollo de la micoflora de las semillas durante el transcurso del almacenamiento.

RIASSUNTO

SULL'IMPIEGO DI UN CONTATORE ELECTRONICO DI PARTICELLE IN MICOLOGIA CEREALICOLA

In questa nota sono presentati degli esempi di nuove applicazioni di un contatore elettronico di particelle nel campo della micologia cerealicola :

— determinazione di parametri che permettono di valutare il potenziale d'espansione e lo stato fisiologico di una popolazione conidiale : entità numerica, indice di gonfiamento, potere germinale e tasso di sopravvivenza.

— determinazione delle curve di distribuzione delle taglie delle conidi delle muffe dominanti nel granturco.

— valutazione rapida dello sviluppo della micoflora dei chicchi durante l'immagazzinamento.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barnes M., Parker M. S., 1967. Use of the Coulter counter to measure osmotic effects on the swelling of moulds spores during germination. *J. gen. Microbiol.*, **49**, 287-292.

Barnes M., Parker M. S., 1968. Automatic sizing of moulds spores. *Trans. brit. Mycol. Soc.*, **51**, 33-39.

Claveau J., Scriban R., Strobbel B., Carpentier Y., 1968. Étude biométrique des levures en brasserie. Cas particulier : biométrie et microbiologie de quelques levures d'infection. *Brasserie*, **253**, 77-90 ; **254**, 141-153.

LAFON-LAFOURCADE S., 1968. Utilisation d'un compteur de particules pour la numération et l'étude de la taille des levures de vin. *Ann. Technol. agric.*, **17** (3), 241-251.

MC CALLAN S. E. A., 1958. Determination of individual fungus spore volumes and their size distribution. *Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant Res.*, **19**, 303-320.

POISSON J., GUILBOT A., 1963-64-65. Action de l'irradiation gamma sur la microflore de surface des grains. *Rapports semestriels au C. E. A.*

POISSON J., CAHAGNIER B., GUILBOT A., 1971. Sur la radiosensibilité des conidiospores des moisissures dominantes du maïs. Incidence sur la radurisation des grains. Publication n° 2591, *Mycopathol. Mycol. appl.* (sous presse).

PONTIGNY J. A., 1966. Un compteur de particules. *Mesures*, **31**, 88-94.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé :* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions ;* f) *résumé* anglais ou destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un nun éro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront une épreuve a corriger.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Oenologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en Josas. On demande deux exemplaires.

Technologie agricole.

Le Directeur-Gérant : M. L. Cagnac

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 3-1972.

Dépôt légal: 1er trimestre 1972. N° d'impression: 1995.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1971

Vol. 20 . N°4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 283-303.

INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA SOLUTION NUTRITIVE SUR LA TENEUR EN DIVERS ACIDES AMINÉS LIBRES ET EN AMMONIAC DES PÉTALES DE ROSES COUPÉES

A. PAULIN

avec la collaboration technique de J.-M. Bureau

Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux après Récolte, C. N. R. S., 92 - Bellevue

RÉSUMÉ

Deux expériences distinctes ont été conduites sur les roses coupées.

L'étude des variations, en fonction du stade d'évolution, des teneurs en acides aminés libres, en ammoniac, en azote protéique de pétales de roses (var. *Baccara*) alimentées en eau, a permis de voir que la protéolyse est déjà dominante lors du plein épanouissement. L'asparagine représente de 50 à 80 p. 100 des acides aminés libres totaux en fonction des stades.

Lorsque la fleur est alimentée en eau, son épanouissement est souvent anormal (bleuissement des pétales) et caractérisé par la présence dans les tissus pétaloïdes de teneurs particulièrement élevées en acides aminés accompagnées d'une chute brutale de la teneur en azote protéique, révélatrices d'une protéolyse accélérée. Cette perturbation du métabolisme azoté, et le bleuissement des pétales qui en semble la conséquence, est évitée par l'emploi de solutions nutritives (variétés *Super Star, Carina, Baccara*). Le rôle joué par l'ammoniac, produit ultime de la dégradation des protéines, est étudié.

Mots clés : *roses coupées, sénescence, métabolisme azoté, solution nutritive.*

Le développement attendu de la vente des fleurs coupées dans les années à venir impose qu'un effort important soit accompli pour améliorer la survie chez l'utilisateur.

La recherche des moyens à mettre en œuvre pour prolonger la vie des fleurs est liée à la connaissance des phénomènes de la sénescence.

LA SÉNESCENCE DES FLEURS

Caractères généraux de la sénescence

D'une façon générale, on peut dire que la sénescence des fleurs coupées est essentiellement caractérisée par une chute de poids frais consécutive à la diminution de la conduction d'eau dans les tiges qui ne peut plus compenser la transpiration, par

un épuisement des substances de réserve du fait des oxydations cellulaires ou de la migration vers d'autres parties de la tige florale et par un fort ralentissement de la capacité de synthèse et de l'activité respiratoire.

Le phénomène le plus visible est une perte d'eau (ULRICH et PAULIN, 1957 ; CARFANTAN, 1970), suivie ou accompagnée d'une perte de matière minérale (ULRICH et PAULIN, 1957) et organique (ULRICH et PAULIN, 1957 ; CARFANTAN, 1970). C'est ainsi que les glucides réducteurs disparaissent des pétales dès le début de l'épanouissement chez les tulipes (CARFANTAN, 1970) et chez les roses (WEINSTEIN, 1957), dès la fin de l'épanouissement chez *Lilium croceum* (COMBES, 1936).

Les substances azotées, sans doute parce que leur métabolisme a semblé lié étroitement à la sénescence, ont fait l'objet de recherches déjà nombreuses. Le phénomène remarquable est une protéosynthèse dominante jusqu'à un stade proche de l'épanouissement, suivie brutalement par une protéolyse intense.

Par ailleurs nos essais sur la capacité d'absorption et de synthèse de la fleur coupée d'*Iris germanica* nous ont permis de montrer que l'activité physiologique de la fleur d'iris (accumulation, synthèse), maximale juste avant le début de l'épanouissement, diminue au cours de la fanaison (ULRICH et PAULIN, 1966).

Les choses sont différentes lorsque la fleur est maintenue sur pied. Celle-ci continue de recevoir l'eau et les substances qui lui sont nécessaires ; de ce fait, elle dispose en permanence des matériaux métabolisables (glucides essentiellement) qui constituent la source d'énergie indispensable aux divers processus métaboliques. Dans ces conditions, la fleur ne va pas détruire aussi activement ses protéines. Les racines élaborent, en outre, des substances (analogues structuraux des purines) qui, diffusant vers les parties aériennes, favorisent la synthèse protéique (CHIBNALL, 1954 ; LOEFFLER et VAN OVERBEEK, 1963). Les synthèses vont être actives pendant un temps plus long et la protéolyse ne l'emportera sur la protéogenèse que plus tardivement.

Ainsi KUC (1964), qui a étudié comparativement le métabolisme de roses coupées et de roses non détachées, a pu voir qu'avec les fleurs coupées la teneur en eau et en glucides passe par un maximum qui coïncide avec le maximum de poids frais ; sur pied, la rose est apte à drainer du glucose au-delà du stade de poids frais maximal. L'azote ammoniacal augmente d'une façon beaucoup plus brutale lorsque la fleur est détachée et les valeurs atteintes sont plus élevées. Les amides continuent d'augmenter seulement pendant les deux jours qui suivent la coupe, alors que l'enrichissement est continu pour les roses maintenues sur pied.

Le métabolisme azoté de la sénescence

Nous venons de le voir, le phénomène caractéristique du métabolisme azoté au cours de l'évolution de la fleur coupée est une protéosynthèse dominante jusqu'au voisinage de l'épanouissement, suivie brutalement par une protéolyse intense.

La brutale inversion du sens de migration de l'azote qui résulte de ce phénomène a été mise en évidence par COMBES sur le lis (1935). Chez la tulipe, la protéosynthèse est dominante jusqu'au début de la pigmentation de la fleur et, dès avant l'épanouissement, c'est la protéolyse qui l'emporte sur la protéogenèse (CARFANTAN, 1970). Ces résultats rejoignent ceux de SCHUMACHER qui, en 1931, sur la fleur de *Phyllocactus*, signalait une accumulation brève des protéines dans la fleur en bouton, suivie

rapidement d'une chute considérable. Dans les fleurs d'*Iris germanica* les taux d'azote soluble et d'azote protéique de la fleur, analysés aux divers stades d'évolution, montraient que la protéolyse est déjà dominante au moment du plein épanouissement (PAULIN et ULRICH, 1962). VILLERET (1970), sur *Iris pseudacorus*, a mis en évidence un accroissement régulier de la teneur en azote aminé (libre et peptidique) au cours du développement des fleurs jusqu'au plein épanouissement. Au moment du flétrissement, la diminution de l'azote protéique traduirait une protéolyse certaine (VILLERET, 1970). Chez les roses coupées, la teneur en azote protéique diminue d'une façon régulière au cours de l'évolution de la fleur, cependant que l'azote ammoniacal augmente dans des proportions considérables lors du stade ultime (WEINSTEIN, 1957). BRUNEL-CAPELLE (1967), étudiant le métabolisme azoté de l'*Arum italicum*, a observé un accroissement d'azote soluble beaucoup plus important que l'accroissement d'azote protéique aux stades évolués de l'inflorescence, l'azote des acides aminés ne représentant d'ailleurs qu'une part assez faible de l'azote soluble. Rappelons que le ralentissement de la protéogenèse lors de la sénescence semble être un phénomène général chez les végétaux supérieurs (TAVANT, 1967).

Les variations individuelles des acides aminés au cours de l'évolution de la fleur ont été étudiées par plusieurs chercheurs et en particulier par WEINSTEIN sur la rose *Better Times* (1957). Pour cet auteur, l'acide glutamique diminue régulièrement au cours du vieillissement ; la valine, la leucine, la tyrosine, l'alanine, la glutamine augmentent au moment de l'épanouissement pour diminuer ensuite. L'asparagine, qui représente 65 à 90 p. 100 du total des acides aminés dosés dans les pétales, accuse une brutale augmentation de teneur lors de l'épanouissement ; les fortes valeurs atteintes se maintiennent lors de la fanaison. Pour WEINSTEIN, ces résultats permettent de penser qu'après une utilisation préférentielle de métabolites respiratoires comme le glucose, les tissus des pétales utilisent d'abord l'acide glutamique, puis la valine, la leucine, l'isoleucine, la tyrosine, l'alanine et la glutamine. Cependant, toujours selon WEINSTEIN, le phénomène de la protéolyse débute tôt et est indépendant du taux de substrats respiratoires disponibles.

Selon BRUNEL-CAPELLE, au moment du dégagement de chaleur qui caractérise la préanthèse de l'inflorescence d'*Arum italicum*, les acides aminés les plus abondants dans la partie supérieure du spadice sont l'acide glutamique, l'alanine, la valine et surtout l'ensemble sérine + amides. A ce stade, la proline présente une élévation considérable de teneur dans les fleurs mâles (BRUNEL-CAPELLE, 1967). Avec l'*Iris germanica*, nous avons pu montrer que les acides aminés qui présentent les plus fortes variations de teneur entre le stade initial et le plein épanouissement sont l'asparagine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, la valine, la leucine. D'ailleurs, au stade de plein épanouissement, la protéolyse est déjà dominante chez l'iris, rappelons-le. Enfin, la présence aux stades de totale fanaison de teneurs encore élevées en acides aminés permet de penser que la protéolyse se poursuit jusqu'aux stades ultimes (PAULIN, 1963). Pour VILLERET (1970) les acides aminés qui montrent une variation significative au cours du développement de la fleur d'*Iris pseudacorus* sont l'alanine, la proline, l'acide glutamique, la sérine, l'acide aspartique. Pour cet auteur également, l'azote aminé libre ne représente d'ailleurs qu'une fraction de l'azote soluble. Dans les pétales de *Lilium candidum*, ROSSETTI (1966, 1967) a mis en évidence les amino-acides suivants : acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycine, α-alanine, acide γ-aminobutyrique, glutamine.

Notons d'autre part que la protéolyse du périanthe des tulipes s'accompagne d'une *migration des substances azotées* vers le pistil et les étamines (CARFANTAN, 1970). Chez l'*Iris germanica*, dès le début de la fanaison, les pièces pétaloïdes abandonnent au profit de l'ovaire une fraction sans cesse croissante des acides aminés synthétisés ou absorbés au moment de l'épanouissement (PAULIN, 1969). Chez l'*Iris pseudacorus*, on assiste dès l'épanouissement à une migration d'azote des pièces pétaloïdes vers l'ovaire (VILLERET, 1970). Chez les orchidées, l'azote émigre du périanthe vers le gymnostème dès que la pollinisation est effectuée (GESSNER, 1948).

Enfin, l'augmentation des quantités d'acides aminés lors des stades évolués, si elle est due pour une plus grande part au phénomène de protéolyse, peut pour une certaine fraction être le résultat de la *formation directe d'acides aminés* ; c'est une hypothèse que retient BRUNEL-CAPELLE (1967). En ce qui nous concerne, nous avons décelé une synthèse aminée appréciable dans les fleurs fanées d'*Iris germanica* (ULRICH et PAULIN, 1966).

Les substances nécessaires à la fleur coupée

Compte tenu de ce que nous savons du métabolisme de la fanaison, on peut penser, pour tenter de ralentir l'*inévitable* acheminement vers la sénescence, fournir à la fleur, en plus de l'eau indispensable, des matériaux métabolisables, et plus particulièrement des substances aptes à maintenir un certain niveau de l'activité de protéosynthèse. Mais si l'on veut que ces substances, nécessairement fournies en solution dans l'eau, parviennent à la fleur, il faut que la circulation de liquide dans la hampe florale soit facile, ce qui n'est pas toujours le cas du fait de la formation de cals d'origine microbienne ou physiologique.

L'eau.

Nous l'avons dit plus haut, un des premiers symptômes de la sénescence est une perte de poids frais. A température ordinaire, les pertes d'eau par transpiration sont importantes ; ce sont ces pertes d'eau qui sont responsables de la courbure de la partie supérieure de la tige si fréquente avec les roses (SMITH, 1965, 1966). Ajoutons que la teneur en eau des tissus joue un rôle dans la synthèse des protéines.

Les glucides.

La principale fonction des glucides est d'être une source d'énergie pour les processus métaboliques de la fleur (LARSEN et SCHOLES, 1965). Les glucides agiraient également sur la transpiration en modifiant le degré d'ouverture des stomates (COORTS, GARTNER et MCCOLLUM, 1965 ; MAROUSKY, 1969).

Les substances azotées.

Les substances azotées sont généralement fournies dans le but de favoriser la protéosynthèse. Diverses substances ont été proposées : hexaméthylènetétramine, diéthanolamine... dont on ne sait si elles sont réellement utilisables par la fleur.

Les kinétines qui paraissent aptes à maintenir dans les tissus un taux élevé en

substances protéiques (MOREL, 1962 ; OSBORNE, 1962) peuvent être utilisées. Il en serait de même de l'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique qui, selon OSBORNE et HALLAWAY (1964), retarderait la disparition des protéines.

Les antiseptiques.

Le plus couramment utilisé est le nitrate d'argent (NICHOLS, 1964, 1965 ; SMITH, 1965, 1966). Le formol a été retenu dans deux solutions commerciales. Nous avons obtenu de bons résultats avec le thymol. Le sulfate de 8-hydroxyquinoléine, dont nous parlerons plus loin, inhibe le développement des moisissures (LARSEN et CROMARTY, 1967).

Les substances anticals.

Un certain nombre de substances permettent d'empêcher la formation de cals physiologiques, c'est-à-dire des bouchages dont l'origine n'est ni fongique ni bactérienne. Les plus connues de ces substances sont les sels de quinoléine et particulièrement le sulfate et le citrate de 8-hydroxyquinoléine qui passent pour modifier le pH des solutions (COORTS, GARTNER et MC COLLUM, 1965 ; LARSEN et SCHOLES, 1965, 1966), exerçant ainsi un ralentissement des actions enzymatiques (peroxydase en particulier) responsables de l'oxydation de substances libérées par les cellules lésées au moment de la coupe (MAROUSKY, 1969). C'est un fait que les fleurs se conservent mieux dans une solution à pH 4 que dans une solution à pH 6. Pour COORTS *et al.* (1965), la réduction des cals serait due aux propriétés chélatantes des sels de quinoléine. Il semble que ces dérivés de la quinoléine exercent également une action sur la transpiration en modifiant l'ouverture des stomates (SCHOLES, 1963 ; LARSEN et SCHOLES, 1965 ; MAROUSKY, 1969). Lorsque les fleurs sont alimentées en sulfate de 8-hydroxyquinoléine, leur poids frais augmente (SCHOLES, 1963 ; MAROUSKY, 1969). Enfin, nous avons pu montrer que le sulfate de 8-hydroxyquinoléine favorise la montée des glucides (PAULIN, 1969).

Rappelons que diverses substances connues pour inhiber la respiration, la croissance ou la transpiration, ont été préconisées par certains. Signalons seulement que les solutions nutritives les plus efficaces provoquent une augmentation (et non un ralentissement) de la respiration (COORTS, GARTNER et MC COLLUM, 1965 ; WILKINS, 1965). Pour terminer, mentionnons que les sels métalliques (ceux de cuivre en particulier) ont été recommandés (MARLIN et ROGERS, 1963 ; WEINSTEIN et LAURENCOT, 1963) pour éviter le bleuissement des pétales qui va retenir maintenant notre attention.

Le bleuissement anormal des pétales

Une des premières actions favorables que nous avons constatée dans nos essais d'efficacité de solutions nutritives était relative au maintien de la coloration des pétales pendant tout le temps de la survie.

CURREY et GEOFFREY (1927) travaillant avec la variété de roses *George Dickson* pensent que la cause du bleuissement peut être attribuée à un manque de tanins. TWIGG (1952) n'a pas enregistré de variations sensibles de teneur en tanins dans les pétales de roses au cours de l'évolution. Il attribue le bleuissement à une augmenta-

tion des pigments anthocyaniques ainsi qu'à un accroissement du taux de potassium et à une valeur élevée du pH des tissus. Pour HALEVY *et al.* (1965-1966), le bleuissement des pétales de roses *Baccara* (observé à basse température) pourrait trouver son origine dans une augmentation de la concentration en pigments des tissus. KUC (1964) estime que les variations de couleur observées dans les pétales sont en relation directe avec l'accumulation d'ammoniac dans les tissus. Les fleurs maintenues sur pied, du fait de la permanence de la synthèse d'amides et du rôle de détoxication joué par celles-ci, ne bleuissent pas. Pour WEINSTEIN (1957) le rôle de l'ammoniac paraît également déterminant dans l'apparition du bleuissement ; en effet, une augmentation du pH due à la présence d'NH_3 libre peut être une cause suffisante pour provoquer la variation de couleur, le pigment étant très sensible aux variations de pH.

A titre documentaire, signalons que WEINSTEIN (1957) a identifié une seule anthocyane dans les pétales de roses *Better Time* : la cyanidine 3,5-diglucoside. HALEVY (1965-1966) dans les tissus pétaloïdes de la rose *Baccara* en a identifié 2 : la cyanidine 3,5-diglucoside et la pelargonidine 3,5-diglucoside.

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Le matériel vivant

Compte tenu de ces résultats, il nous a paru normal de rechercher si le bleuissement était effectivement lié à une perturbation du métabolisme protéique.

Par ailleurs, l'évolution des teneurs en aminoacides des pétales de roses, du jeune bouton à l'ultime fanaison, nous a semblé indispensable à connaître, ne serait-ce que pour permettre les comparaisons avec le matériel vivant lors des essais mettant en œuvre les solutions nutritives.

C'est donc finalement 2 types d'expériences distincts que nous avons réalisés :

1. *Expérience A :* étude des variations des teneurs en acides aminés de pétales de roses en fonction du stade d'évolution de la fleur. Des roses, variété *Baccara*, récoltées au stade bouton ouvert, décrit tableau 1, sont alimentées en eau. L'évolution des roses est suivie régulièrement et des prélèvements de 5 fleurs correspondant aux stades d'évolution du tableau 1 sont effectués d'une manière échelonnée. Il convient de noter que, lorsqu'elles sont alimentées en eau, un bon nombre de roses ne s'épanouissent pas normalement ; celles-ci ont été éliminées.

TABLEAU I

Stades d'évolution des roses coupées

Stades	Caractéristiques de chaque stade
1	*Bouton ouvert.* Pétales tous imbriqués à l'exception des plus externes qui commencent à se déployer.
2	*Plein épanouissement.* La fleur est totalement épanouie.
3	*Début de fanaison.* Les pétales externes commencent à se recroqueviller. Les étamines sont démasquées.
4	*Pleine fanaison.* De nombreux pétales commencent à se friper.
5	*Ultime fanaison.* Les pétales se détachent avec grande facilité, des variations de couleur sont apparues.

2. *Expérience B :* étude comparée de la fraction aminée des pétales de roses alimentées en eau ou avec une solution nutritive apte à améliorer l'épanouissement, en évitant en particulier toute modification de coloration. Cette étude a été effectuée avec les variétés de roses *Super Star, Carina* et *Baccara*. Dans chaque expérience, 3 lots de 3 fleurs ont été constitués :

— 1 lot initial fixé immédiatement après la cueillette ;

— 2 lots placés à l'issue de la récolte en chambre isotherme, l'un alimenté en eau, l'autre avec une solution nutritive.

Avant la mise en alimentation, on a procédé au rafraîchissement des sections. Les feuilles de la base ont été supprimées de façon à éviter le contact du feuillage avec la solution.

L'expérience est arrêtée lorsque les fleurs du lot alimenté en eau présentent une modification visible de la couleur des pétales. A ce moment, les stades d'évolution des fleurs des 2 lots ne sont pas forcément comparables, et ne correspondent pas obligatoirement à un stade du tableau 1. En effet, nous l'avons dit plus haut, des fleurs qui sont alimentées en eau présentent souvent en plus du bleuissement des pétales un épanouissement incomplet. Une expérience particulière (exp. B_2) réalisée avec la variété *Carina* a été consacrée à comparer les teneurs respectives en acides aminés d'un lot n'ayant pas présenté de bleuissement (lot alimenté avec une solution nutritive efficace), d'un lot ayant légèrement bleui (application d'une solution nutritive de moindre efficacité), enfin d'un lot ayant présenté un bleuissement des pétales très accusé (lot alimenté en eau).

Dans les 2 types d'expériences l'étude de l'évolution des acides aminés a été complétée par une étude de l'évolution de l'azote protéique.

Le stade à la cueillette correspond au stade « bouton ouvert ».

Toutes les roses qui provenaient de la même serre nous ont été gracieusement offertes par la S. I. C. A. Flora-France à Mandres.

Les solutions nutritives

Les formules suivantes ont été utilisées :

— variété *Super Star* et *Baccara* : saccharose 40 g, urée 100 mg, sulfate de 8-hydroxyquinoléine 100 mg/l ;

— variété *Carina* : même formule avec en plus sulfate d'hydrazine 2,5 mg/l. Des oligo-éléments ont été, en outre, apportés.

Ces solutions ont été réalisées dans l'eau distillée.

La hauteur de liquide dans les récipients d'alimentation a été de 8 cm pour 1 litre de solution par récipient.

Les conditions de conservation

Pendant toute la durée de l'expérience les fleurs ont été placées en chambre isotherme à + 23°C. Un éclairage de 2 000 lux (au niveau des roses) a été appliqué 2 fois 6 heures par 24 heures.

Les solutions n'ont pas été renouvelées.

Des observations journalières ont été effectuées ; le stade d'évolution a été soigneusement noté. Une attention toute particulière a été portée à la couleur des pétales ainsi qu'au déroulement de l'épanouissement.

Les méthodes d'analyse

Seuls les pétales ont été soumis aux analyses, celles-ci ont concerné : le pH du suc cellulaire, la teneur en acides aminés libres, la teneur en azote protéique.

pH du suc cellulaire.

Ces mesures, qui n'ont intéressé que quelques lots, ont été effectuées à partir de 10 g de pétales frais, broyés en présence de 40 ml d'eau distillée.

Teneur en acides aminés.

Les pétales des expériences B ont été fixés à l'alcool bouillant, ceux de l'expérience A ont été congelés dans l'azote liquide et desséchés par lyophilisation.

Une étude comparative des deux modes de fixation vis-à-vis de la conservation des acides aminés a été effectuée sur des pétales de roses *Baccara*. Les résultats des dosages ont été regroupés dans le tableau 2. Son examen permet de voir que les teneurs en acides aminés dosés sont plus élevées d'environ 20 p. 100 dans le lot fixé à l'alcool bouillant.

TABLEAU 2

Teneurs comparées en acides aminés de roses fixées par lyophilisation ou par l'alcool bouillant

(teneurs en μM d'acides aminés/g de matière fraîche)

Acides aminés	Lot congelé et lyophilisé	Lot fixé à l'alcool bouillant
Thr	1,25	1,39
Ser	2,37	2,84
Asp	3,06	3,86
Asp-N	17,6	21
Glu	2	2,72
Ala	1,25	1,64
Val	0,87	0,75
Phe	0,5	0,86
NH_3	9,2	12,6

La durée de microsublimation ne semble pas être en cause puisque pour les 8 grammes de pétales l'opération a duré moins de 24 heures. Peut-être faut-il incriminer la conservation ultérieure sous vide ? Des essais complémentaires seraient à effectuer en comparant le mode de conservation sous vide (appliqué à l'issue de la lyophilisation) au mode de conservation sous atmosphère d'azote. En effet dans une autre expérience effectuée avec des pièces pétaloïdes d'*Iris germanica*, les teneurs en acides aminés étaient au contraire légèrement plus élevées dans le lot lyophilisé (12 p. 100).

Les extraits alcooliques ont été concentrés jusqu'à une proportion connue et conservés tels quels pour l'analyse.

Des essais préalables ont montré que les opérations de défécation à l'acide trichloracétique ou de séparation des fractions par passage sur résines échangeuses d'ions n'étaient pas indispensables.

Les lyophilisats sont repris par l'eau tiède et (après concentration et ajustement du pH) utilisés également tels quels.

Les dosages ont tous été effectués à l'auto-analyseur d'acides aminés Technicon (colonne de 140 cm sur 6 mm de diamètre interne remplie de résine chromobeads A). Les acides aminés ont été élués par 3 tampons de pH 2,87-3,8-5 préconisés par Technicon. Le débit de la pompe, maintenu à 0,5 ml/mn, a permis l'obtention de chromatogrammes en 21 heures. Deux régimes thermiques ont été, selon les chromatogrammes, appliqués à la colonne de résine :

— régime 1 : 40°C pendant les 2 h 45 suivant le dépôt de l'échantillon, puis 60°C.

— régime 2 : 30°C pendant 4 h 30, puis 60°C. Le régime 2 permet une meilleure résolution en ce qui concerne les acides aminés suivants : thréonine, sérine, asparagine souvent difficiles à séparer.

On ajoute 250 μM de norleucine à tous les échantillons au moment de l'injection. Les teneurs ont été classiquement calculées par référence au pic de norleucine et exprimées en μM de chacun des acides aminés contenus dans 3 ou 5 fleurs, également en μM/g de matière lyophilisée pour l'expérience A.

Certains pics, se rapportant à des acides aminés présents en très faibles quantités, se sont révélés trop petits pour être calculables sans erreur importante ; les acides aminés correspondants ont été considérés comme non dosables.

Teneur en azote protéique.

Les dosages d'azote ont été effectués par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Nessler et décrite par THOMPSON et MORRISON (1951) après une minéralisation classique sur matériel lyophilisé et réduit en poudre.

RÉSULTATS

1. — *Variations des acides libres en fonction des différents stades d'évolution de la fleur*

Les variations de teneur des différents acides aminés présents dans les pétales de rose, du stade initial au stade ultime de fanaison, apparaissent sur les figures 1 et 2. L'étude de ces figures, ainsi que de la figure 3 se rapportant aux variations de l'azote protéique, permet les remarques suivantes :

C'est au stade 2, plein épanouissement, que la fleur renferme la teneur globale la plus élevée en acides aminés libres.

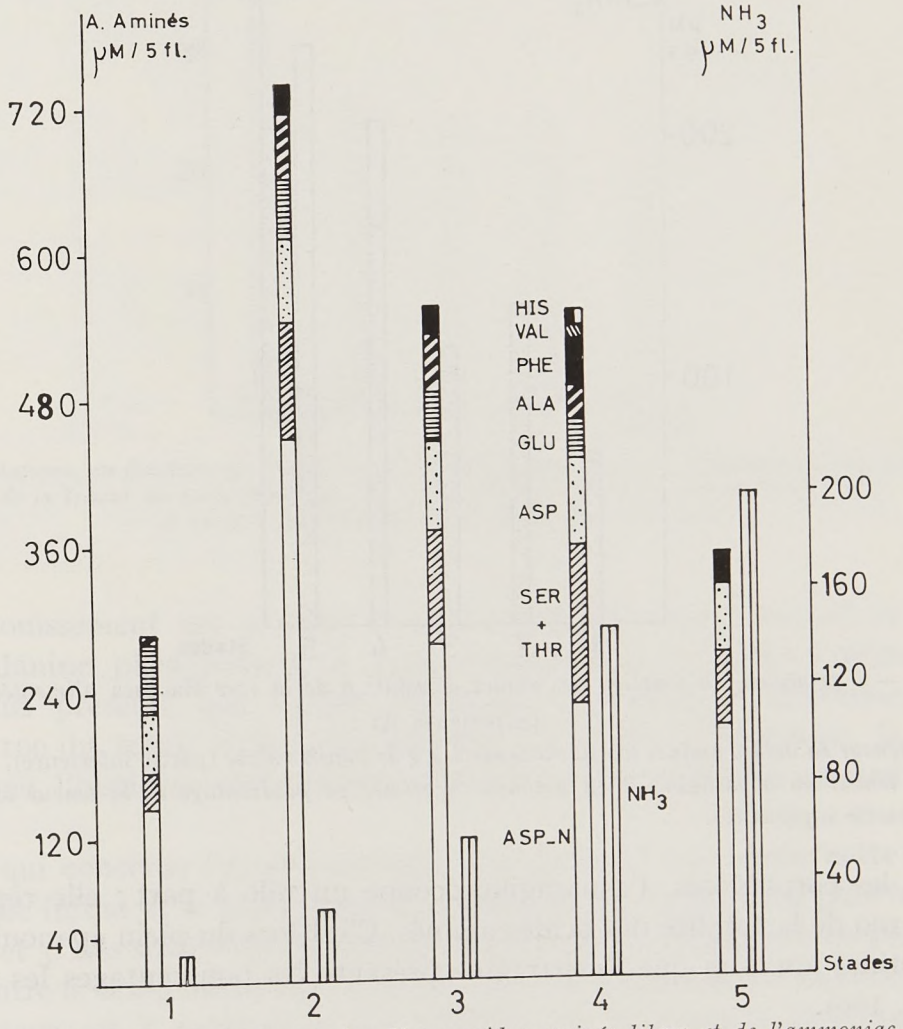


FIG. 1. — *Variations de la teneur des divers acides aminés libres et de l'ammoniac présents dans les pétales de rose* Baccara *en fonction des stades d'évolution*

(fleurs alimentées en eau, expérience A)

Les stades de début de fanaison (st. 3) et de pleine fanaison (st. 4) correspondent à des quantités globales comparables d'acides aminés. Ces teneurs sont légèrement inférieures à celles observées lors du plein épanouissement. Au moment de l'ultime fanaison (st. 5) l'appauvrissement de la fleur en acides aminés (teneur totale) est très marqué.

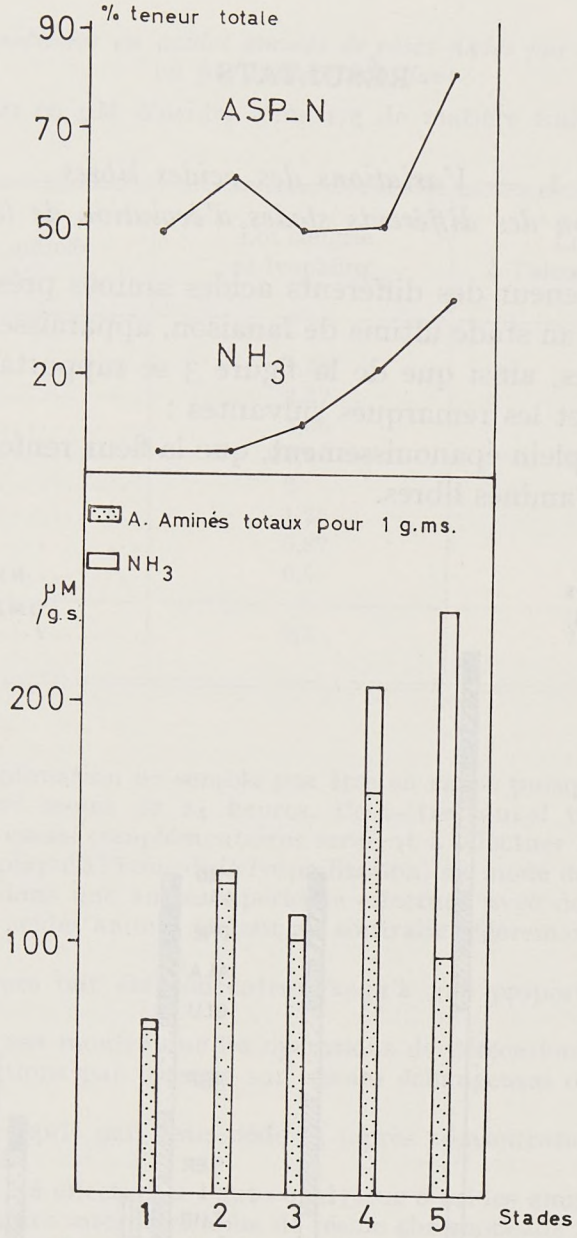


FIG. 2. — *Variations, en fonction des stades d'évolution de la rose* Baccara *alimentée en eau* (expérience A) :

— *de la teneur en acides aminés totaux ramenée à 1 g de matière sèche* (partie inférieure),

— *de la teneur en asparagine et en amoniac exprimée en pourcentage de la teneur totale en acides aminés* (partie supérieure).

Parmi les corps dosés, l'asparagine occupe un rôle à part ; elle représente de 50 à 80 p. 100 de la totalité des acides aminés. C'est lors du plein épanouissement et lors de l'ultime fanaison que l'asparagine présente les pourcentages les plus élevés (61 et 81 p. 100).

La thréonine, la sérine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, la phénylalanine sont relativement abondants. La valine, l'isoleucine, la leucine, la tyro-

sine, la lysine, l'histidine, l'arginine sont, par contre, très peu abondants et le plus souvent non dosables dans nos conditions d'expérience.

L'ammoniac, toujours présent en quantités notables, augmente régulièrement depuis le jeune bouton jusqu'au stade final.

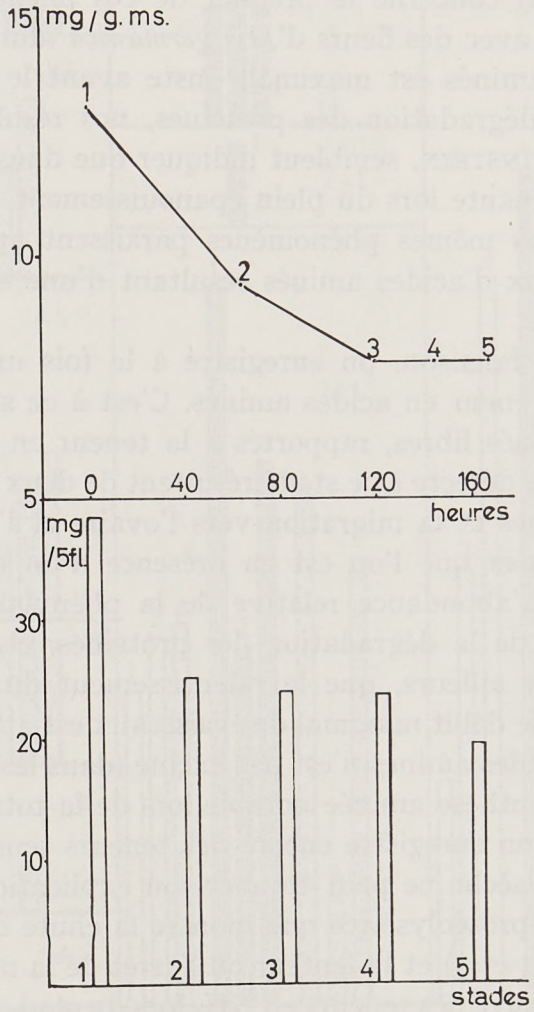


FIG. 3. — *Variations, en fonction des stades d'évolution de la rose* Baccara, *alimentée en eau* (expérience A), *de la teneur en azote protéique par g de matière lyophilisée* (partie supérieure) *et valeurs rapportées à 5 fleurs* (partie inférieure).

L'épanouissement est caractérisé par un enrichissement massif en thréonine + sérine, alanine, phénylalanine et surtout asparagine. Au stade d'ultime fanaison ne sont plus présents que l'acide aspartique, la sérine + thréonine, l'asparagine (82 p. 100 du total) et la phénylalanine. La sérine + thréonine, la valine, la phénylalanine, l'histidine sont présents en pourcentage maximum au stade de pleine fanaison.

En ce qui concerne l'azote protéique, on assiste à une chute nette de teneur entre le stade initial et le plein épanouissement suivie d'une chute plus faible entre les stades 2 et 3. Les stades finaux présentent des teneurs identiques. La perte d'azote protéique entre le stade initial et le premier stade de fanaison est d'environ 38 p. 100. Ce pourcentage est à rapprocher des résultats de WEINSTEIN pour qui la perte d'azote protéique enregistrée dans les pétales de roses 96 heures après la cueillette est d'environ 32 p. 100 (1957).

Discussion.

Que le plein épanouissement se caractérise par une quantité maximale en acides aminés libres par fleur n'est pas pour surprendre. L'accumulation d'azote aminé résulte de 2 phénomènes : l'afflux de matières azotées et la dégradation déjà active des protéines. En ce qui concerne le premier de ces phénomènes, rappelons que nous avons pu montrer, avec des fleurs d'*Iris germanica* alimentées en glucose, que la synthèse des acides aminés est maximale juste avant le plein épanouissement. En ce qui concerne la dégradation des protéines, nos résultats, qui sont en bon accord avec ceux de WEINSTEIN, semblent indiquer que dans les pétales de roses la protéolyse est déjà dominante lors du plein épanouissement.

Bien qu'atténués, les mêmes phénomènes paraissent applicables au stade de début de fanaison : afflux d'acides aminés résultant d'une synthèse encore active, protéolyse encore intense.

Au stade de pleine fanaison, on enregistre à la fois un ralentissement de la protéolyse et une forte teneur en acides aminés. C'est à ce stade que la fleur est la plus riche en acides aminés libres, rapportés à la teneur en matière sèche. Comme les acides aminés que l'on détecte à ce stade résultent de deux phénomènes : la dégradation locale des protéines et la migration vers l'ovaire et l'axe floral des produits hydrolysés, on peut penser que l'on est en présence d'un ralentissement ou d'un arrêt de la migration. L'abondance relative de la phénylalanine et de la valine, qui dérivent facilement de la dégradation des protéines, étaie cette hypothèse. Il est possible de dire, par ailleurs, que le ralentissement du courant de migration peut être dû au fait que le débit maximal des vaisseaux est atteint. Notons enfin que la formation directe d'acides aminés n'est pas exclue (dans les fleurs d'*Iris germanica* on détecte encore une synthèse aminée notable lors de la totale fanaison).

Qu'au stade ultime on enregistre encore des teneurs sensibles en acides aminés rapportées à la matière sèche ne peut trouver son explication que par le maintien tardif du phénomène de protéolyse (ce que montre la chute d'azote protéique, pour 5 fleurs, entre les stades 4 et 5) et la lenteur ou l'arrêt de la migration.

L'augmentation massive des teneurs en NH_3 lors du stade 4 et surtout 5 confirme la dégradation des substances azotées qui caractérise la fanaison. Cette accumulation importante d'NH_3 permet de penser également, que la synthèse d'amide a cessé à ces stades, ou qu'elle ne peut progresser assez vite pour utiliser tout l'ammoniac, ou bien encore qu'il n'y a pas suffisamment d'acide aspartique libre.

2. — *Teneurs comparées en acides aminés et en ammoniac de fleurs alimentées en eau ou en solutions nutritives*

L'examen du tableau 3 et des figures 4, 5 et 6 permet les remarques suivantes :

Les teneurs initiales en acides aminés libres varient d'une variété à une autre dans des proportions importantes. Ce qui est intéressant à examiner ce sont, pour chacune des variétés étudiées, les variations enregistrées entre les lots initiaux, les lots à pétales bleuis et les lots à évolution normale.

Les lots ayant présenté une modification de couleur (c'est-à-dire dont l'épanouissement n'a pas été normal) se caractérisent par une teneur globale en acides aminés dosables plus élevée que ceux qui ont réalisé, grâce à la solution nutritive, un épanouissement exempt de bleuissement.

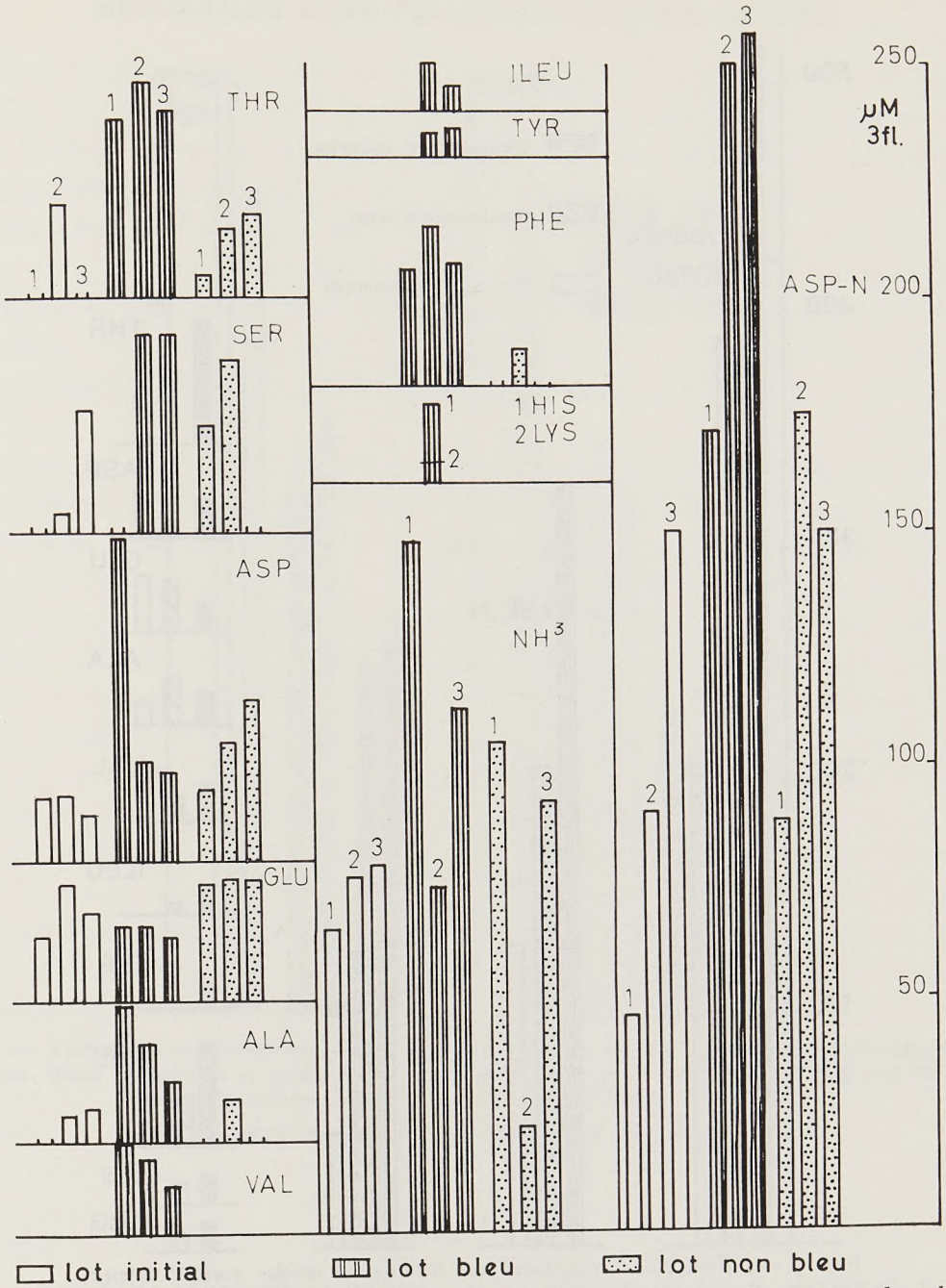


FIG. 4. — *Variations comparées des teneurs en acides aminés et en ammoniac présents dans les pétales du lot initial, du lot bleui* (alimenté en eau), *du lot non bleui* (alimenté avec une solution nutritive), *des variétés de roses* Super Star (1), Baccara (2), Carina (3) (expérience B)

TABLEAU 3

Variations comparées des teneurs en acides aminés libres totaux présents dans les pétales du lot initial, du lot bleui (alimenté en eau), *du lot non bleui* (alimenté avec une solution nutritive)

(Expérience B)

Variétés	µ M d'acides aminés pour 3 fleurs		
	Lot initial	Lot bleui	Lot non bleui
Super Star	74,4	372,2	133,6
Baccara	169,4	480,2	281,8
Carina	210,6	437,9	264,8

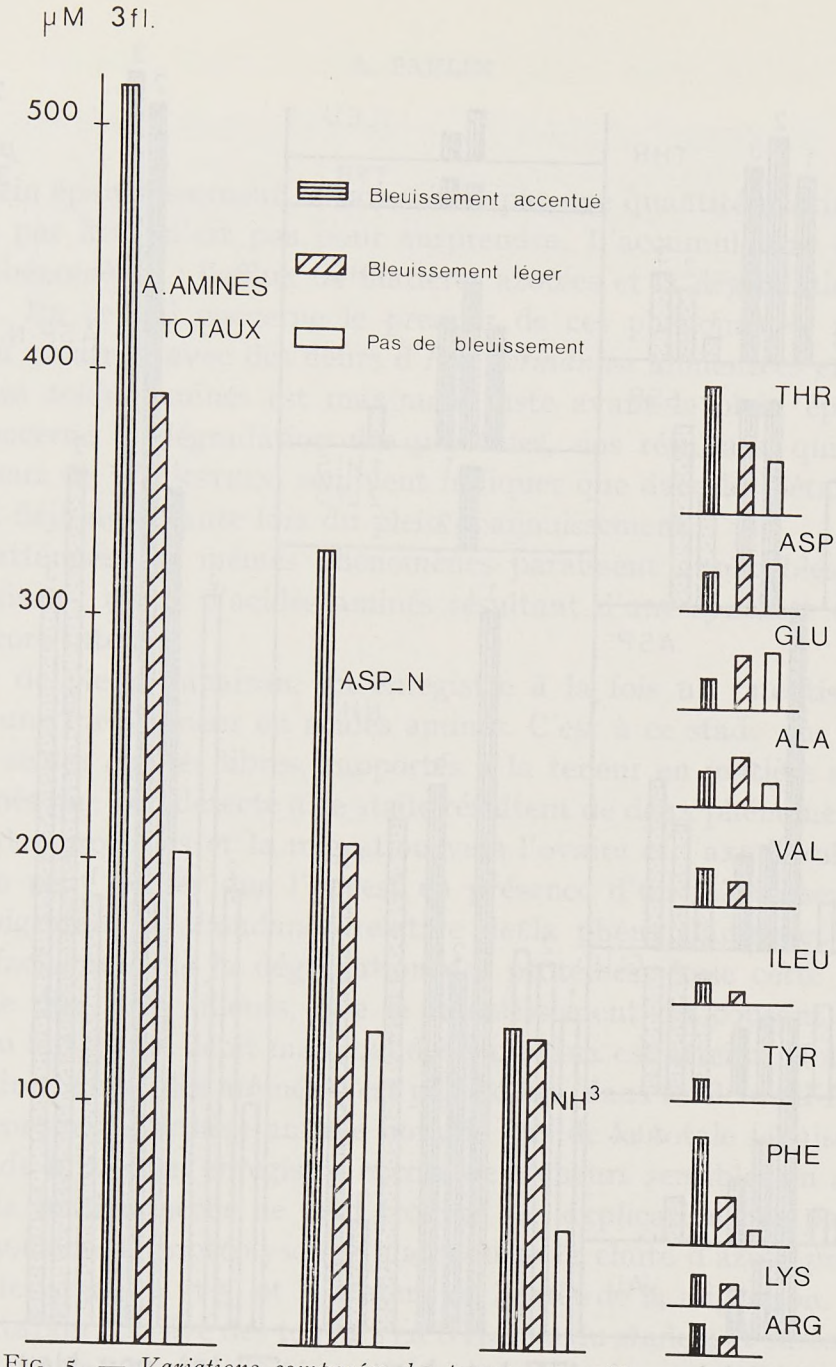


FIG. 5. — *Variations comparées des teneurs en acides aminés totaux et des teneurs absolues de chacun des acides dosés de lots plus ou moins décolorés* (variété *Carina*, expérience B_2)

TABLEAU 4

Teneurs comparées en acides aminés présents dans les pétales du lot initial, du lot bleui, du lot non bleui, exprimées en µM d'acides aminés/g de matière fraîche

Variétés	Lot initial	Lot bleui	Lot non bleui
Baccara	19,20 (13,3)*	47,7 (41,3)	18 (16,7)
Carina	23,6 (17,2)	40,4 (32,1)	18,2 (13,4)
Super Star	16,1 (8,6)	30,4 (21,7)	16,6 (9,3)

* ( ) sans NH_3.

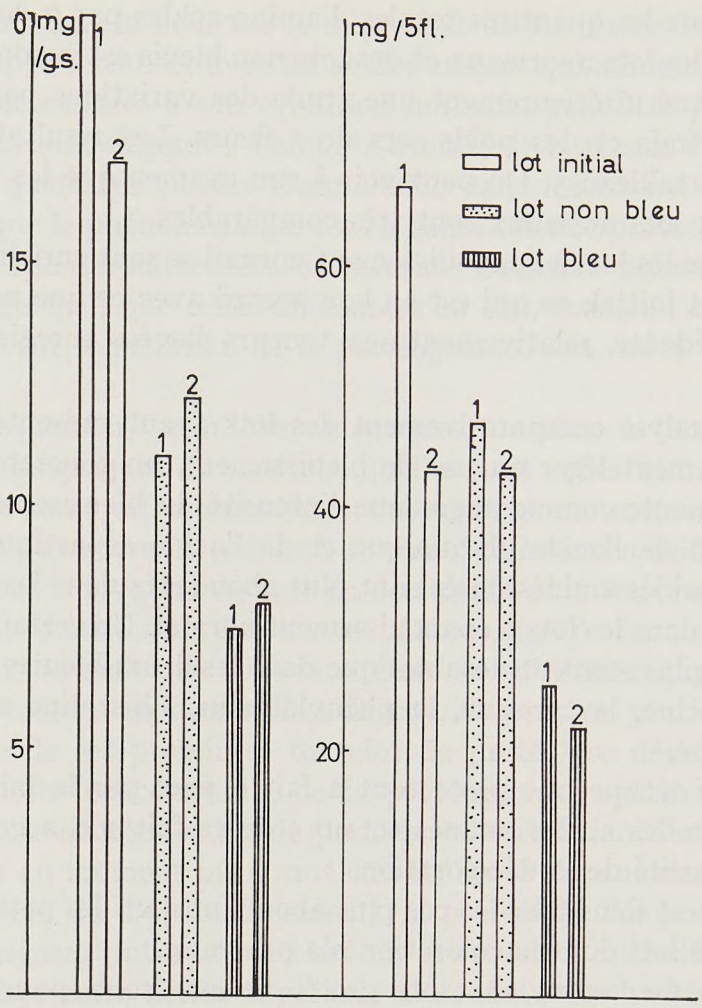


FIG. 6. — *Variations comparées des teneurs en azote protéique présent dans les pétales des lots initiaux, des lots bleuis* (alimentés en eau), *des lots non bleuis* (alimentés avec une solution nutritive), *par g de matière lyophylisée et valeurs rapportées à 5 fleurs.*

1 : *variété* Super Star ; 2 : variété *Carina* (Expérience B)

TABLEAU 5

Variations comparées de la teneur en eau des lots bleuis et non bleuis, par rapport au lot initial

Variétés	Lot initial			Lot bleui			Lot non bleui		
	PF	PS	Teneur en eau (1)	PF	PS	Teneur en eau (1)	PF	PS	Teneur en eau (1)
Super Star	18,57	3,32	82,12	23,1	3,38	85,36	28,8	4,3	85
Baccara	18,8	3,32	82,3	21,6	3,57	83,47	27,4	4,7	82,84
Carina	19,4	2,57	86,7	22,3	2,73	87,8	28,5	3,5	87,7

PF : Poids frais de 5 fleurs.
PS : Poids sec de 5 fleurs lyophilisées.
(1) : Teneur en eau en p. 100 du poids frais.

Si l'on exprime les quantités totales d'amino-acides par g de tissu frais, l'écart entre les teneurs des lots anormaux et des lots non bleuis est encore plus net (tabl. 4). Nous avons effectué ultérieurement une étude des variations par rapport au stade initial des poids frais et des poids secs de 5 fleurs. Les résultats obtenus ont été regroupés dans le tableau 5. On peut voir à son examen que les teneurs en eau des lots altérés et des lots normaux sont très comparables.

On notera que les lots à épanouissement normal se sont enrichis en acides aminés par rapport au lot initial, ce qui est en bon accord avec ce que nous avons vu dans l'expérience précédente, relativement aux teneurs élevées enregistrées lors du plein épanouissement.

Lorsqu'on analyse comparativement des lots ayant présenté un fort bleuissement, un bleuissement léger ou pas de bleuissement, on constate que la teneur en aminoacides augmente comme augmente l'intensité du bleuissement (fig. 5).

A l'exception de l'acide glutamique et de l'acide aspartique (pour 2 variétés sur 3), tous les acides aminés dosés sont plus abondants dans les lots présentant un bleuissement que dans les lots à épanouissement normal. Un certain nombre d'amino-acides ne sont le plus souvent dosables que dans les fleurs bleuies : ce sont l'alanine, la valine, l'isoleucine, la tyrosine, la phénylalanine, l'histidine ainsi que (exp. B_2) la lysine, l'arginine.

L'asparagine occupe une place tout à fait à part par le fait qu'elle constitue de 45 à 70 p. 100 des acides aminés totaux ; de ce fait son accumulation varie en fonction de l'intensité de la décoloration.

L'ammoniac est dans tous les cas plus abondant dans les pétales des lots altérés que dans ceux des lots dont la coloration n'a pas varié.

Des mesures de teneur en azote protéique montrent, pour l'essentiel, que la dégradation des protéines est plus importante pour les lots bleuis que pour les lots à évolution normale (fig. 6).

Discussion.

Les résultats obtenus éclairent quelques points du mécanisme d'action des solutions nutritives.

Lorsque la rose est alimentée en eau, il arrive que l'épanouissement se réalise incomplètement ou d'une façon anormale. On peut penser que dans ces conditions il y a eu un manque de substances nutritives, peut-être parce que l'axe floral n'en recélait pas suffisamment ou qu'un bouchage s'est opposé à leur libre circulation vers la fleur. Ce manque de substances provoque un déséquilibre dont la conséquence semble pouvoir être, soit une destruction plus active des protéines, la fleur cherchant par cette voie une source d'énergie pour son métabolisme, soit un arrêt de la protéogenèse. On assiste à une accumulation d'acides aminés, que montrent les résultats obtenus. On expliquerait ainsi qu'au moment de l'épanouissement (lorsque celui-ci est anormal) on puisse trouver dans la fleur des teneurs en acides aminés comparables et même plus élevées que celles rencontrées dans les conditions normales au stade de pleine fanaison. Plusieurs auteurs, et en particulier Mc Kee, ont signalé que l'asparagine s'accumulait facilement dans les végétaux présentant un métabolisme anormal (Mc Kee, 1962). C'est ainsi que les teneurs élevées en acides aminés enregistrées dans les fleurs ayant présenté un bleuissement sont l'image, soit de la

protéolyse accélérée dont la fleur est le siège, soit de l'arrêt de la protéogenèse, la fleur n'étant plus apte à réaliser avec les acides aminés qui affluent vers elle les synthèses protéiques nécessaires à son évolution normale, peut-être parce que les systèmes enzymatiques sont dégradés. La chute brutale de la teneur en azote protéique et la présence de quantités élevées d'ammoniac dans les tissus des pétales bleuis permet de penser que le phénomène qui est en cause est une protéolyse accélérée.

Le fait que les fleurs alimentées en solution nutritive soient moins riches en acides aminés, à âge égal, que celles alimentées en eau, montre l'action exercée par ces substances soit sur le maintien de la protéogenèse, soit sur le ralentissement de la protéolyse.

On peut se demander, parmi les substances fournies, à l'exclusion de celles données comme antiseptiques ou anticals, quelles sont celles qui sont responsables de cette action. Le sucre est essentiellement donné comme métabolite respiratoire. Lorsqu'il y a carence en sucre, la présence de teneurs élevées en acides aminés permet de penser que la fleur trouve son énergie en détruisant plus activement ses protéines (WEINSTEIN, 1957 ; MASTALERZ, ROGERS et KRONE, 1963). Le sucre jouerait donc un rôle indirect dans le maintien d'un taux élevé de substances protéiques. Lorsque les glucides sont présents en quantité suffisante, la fleur ne pratiquerait pas cette destruction intense de ses protéines; toutefois la protéolyse déjà amorcée (elle est toujours plus ou moins concomitante de la protéogenèse) continue à se dérouler ; le rôle des substances azotées serait de permettre le maintien d'un certain taux de synthèse protéique au moment où normalement, après l'épanouissement (ou même pour certaines espèces dès l'épanouissement), la protéolyse l'emporte sur la protéogenèse. Des expériences futures mettant en œuvre les radioéléments devraient permettre de préciser cette action favorable des substances azotées. Il est à noter que l'emploi de substances azotées sans fourniture de sucre ne permet pas d'éviter les anomalies d'épanouissement.

En ce qui concerne l'ammoniac, produit ultime de la dégradation protéique et dont on pense souvent que son accumulation provoque le bleuissement des roses, il convient de noter qu'en valeur relative il n'est pas plus abondant dans les lots décolorés que dans les lots initiaux. On fera remarquer que ce qui entre en ligne de

TABLEAU 6

pH du suc cellulaire de pétales bleus et non bleus

	Pétales bleus	Pétales non bleus
Baccara	5	4,3
Carina	4,9	4,4
Super Star	5,20	4,9
	5	4,8

Seules les différences de valeur de pH observées entre 2 lots d'une même variété doivent être prises en considération, les valeurs absolues pouvant varier quelque peu d'une expérience à une autre.

compte c'est la teneur absolue et que le bleuissement se déclencherait au-dessus d'un certain seuil de teneur à partir duquel les variations de pH consécutives à l'accumulation d'ammoniac dans les tissus provoqueraient le virage de couleur du pigment. Des mesures de pH effectuées sur différents lots ont montré que les lots bleuis présentent un pH de suc cellulaire plus alcalin que les lots normaux (tabl. 6). On remarquera qu'en valeur absolue l'ammoniac est toujours plus abondant dans les lots bleuis. Il est à noter que l'alimentation avec une solution d'ammoniaque (5 ml d'NH_4OH normal par litre) ne provoque un bleuissement ni plus rapide ni plus intense que lorsque la fleur est alimentée en eau. Des expériences complémentaires, faisant appel à des substances aptes à neutraliser l'ammoniac au fur et à mesure de sa formation, permettraient de voir le rôle joué par cet élément dans le bleuissement des pétales. La quantité de pigment anthocyanique qui varie avec la variété jouerait également un rôle.

La présence dans les seuls lots bleuis d'alanine, de valine, d'isoleucine, de tyrosine, de phénylalanine, de lysine, d'histidine, d'arginine semble due au fait que la protéolyse conduisant à une augmentation de la teneur en différents acides aminés, certains de ceux-ci, qui n'apparaissaient qu'à l'état de traces dans les lots à épanouissement normal, deviennent dosables dans les lots de fleurs à pétales bleuis.

CONCLUSIONS

Comme cela a été vu pour d'autres espèces [*Phyllocactus* (SCHUMACHER, 1931-1932), tulipe (CARFANTAN, 1970) iris (PAULIN et ULRICH, 1962)], l'étude du métabolisme azoté des pétales de roses coupées, à divers stades d'évolution, montre que la protéolyse est déjà dominante lors du plein épanouissement. Parmi les acides aminés dosés, l'asparagine occupe une place prépondérante : de 50 à 80 p. 100 des acides aminés libres totaux en fonction des stades ; ces résultats sont à rapprocher de ceux de WEINSTEIN. L'augmentation continue des quantités d'ammoniac présent dans les pétales semble résulter de la dégradation protéique d'une part, et de l'arrêt ou du ralentissement des migrations au cours de la fanaison d'autre part.

Lorsque l'épanouissement de la rose coupée est anormal (bleuissement des pétales), la présence dans les tissus pétaloïdes de teneurs particulièrement élevées en acides aminés, accompagnée d'une chute brutale de la teneur en azote protéique, semble révélatrice d'une protéolyse accélérée. L'apport de matériaux nutritifs (essentiellement des glucides) permet d'éviter cette modification de couleur. Il apparaît ainsi qu'une perturbation du métabolisme azoté, consécutive à un déséquilibre provoqué par la pénurie de substances nutritives (essentiellement glucidiques) se trouve à l'origine des anomalies d'épanouissement rencontrées avec certaines variétés de roses.

L'ammoniac, produit ultime de la dégradation des protéines, ou des acides aminés non utilisés dans les synthèses protéiques, pourrait au-delà d'un certain seuil d'accumulation, du fait des modifications de pH cellulaire qu'il entraîne, jouer un certain rôle dans l'apparition du bleuissement. Des expériences complémentaires sont à entreprendre à ce sujet.

Reçu pour publication en avril 1971.

SUMMARY

INFLUENCE OF THE NUTRITIVE SOLUTION COMPOSITION ON THE FREE AMINOACID AND AMMONIAC CONTENT IN THE PETALS OF CUT ROSES

Two separate experiments on cut roses have been prosecuted.

The study of variations in content of free aminoacids, ammoniac, proteinic nitrogen in water supplied rose petals (var. *Baccara*), in relation to evolution stages, has shown that proteolysis already prevails in full blooming. Asparagin represents 50 to 80 p. 100 of total free aminoacids, in relation with stages.

When the flower is water-fed, its blooming is often abnormal (blueing of petals) and characterized by the presence, in petaloid tissues, of very high contents of aminoacids, accompagned by a brutal drop in proteinic nitrogen content, showing an accelerated proteolysis. This disturbance of nitrogenous metabolism and the blueing of petals which seems to result from it, is prevented by the use of nutritive solutions (varieties *Super Star, Carina, Baccara*). The influence of ammoniac — a final product of protein degradation — has been studied.

RESUMEN

INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA SOBRE EL PORCENTAJE DE DIVERSOS ÁMINOACIDOS LIBRES Y DE AMONIACO DE LAS ROSAS CORTADAS

Se han llevado a cabo dos experimentos de carácter diferente, respecto a las rosas cortadas :

El estudia de las variaciones, en función de la etapa de evolución, de los porcentajes de los aminoácidos libres, del amoníaco y de nitrógeno proteico de pétalos de rosas (var. *Baccara*) alimentados en agua, ha permitido apreciar que la proteólisis es ya dominante en el momento del pleno desarrollo. La asparagina representa de un 50 a un 80 p. 100 de los aminoácidos libres totales, en función de las diversas etapas.

Cuando la flor es alimentada en agua, su completo desarrollo es anormal frecuentemente (los pétalos tornan al azul) y se caractériza por la presencia, en los tejidos petaloides, de porcentajes particularmente elevados de aminoácidos acompañados de un descenso brutal del porcentaje de ácido proteico que revela una proteólisis acelerada. Esta perturbación del metabolismo nitrogenado, y el azulado de los pétalos que parece ser la consecuencia, se evita por empleo de soluciones nutritivas (variedades *Super Star, Carina, Baccara*). También se estudia el papel desempeñado por el amoníaco, producto final de la degradación de las proteinas.

RIASSUNTO

INFLUENZA DELLA COMPOSIZIONE DELLA SOLUZIONE NUTRITIVA SUL TENORE IN VARI AMMINOACIDI LIBERI E DI AMMONIACA DELLA ROSE TAGLIATE

Due esperimenti distinti sono stati effetuati sulle rose tagliate.

Le studio delle variazioni, in funzione dello stadio dell'evoluzione, dei tenori in amminoacidi liberi, in ammoniaca, in azoto proteico dei petali di rose (var. *Baccara*) alimentate con acqua, ha consentito di rilevare che la proteolisi è già dominante in pieno sboccio. L'asparagina rappresenta da 50 a 80 p. 100 degli amminoacidi liberi totali in funzione degli stadi.

Quando il fiore è alimentato con acqua, il suo sboccio è spesso anormale (i petali si azzurrano) e caratterizzato dalla presenza nei tessuti petaloidi di tenori particolarmente elevati in amminoacidi, accompagnati da un forte abbassamento del tenore in azoto proteico che rivela una proteolisi accelerata. Questa perturbazione del metabolismo dell'azoto come pure l'azzurramento dei petali che ne sembra la conseguenza, si puo' evitare con l'impiego di soluzioni nutritive (varietà *Super Star*, *Carina*, *Baccara*). E' allo studio il ruolo dell'ammoniaca, prodotto ultimo della degradazione delle proteine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BRUNEL-CAPELLE G., 1967. Sur le métabolisme azoté d'*Arum italicum*. *Physiol. vég.*, **5** (2), 139-153.

CARFANTAN N., 1970. Observations préliminaires sur le métabolisme de la fleur de tulipe. *Rev. gén. Bot.*, (77), 313-333.

CHIBNALL A., 1954. Cité par DURKIN et KUC. Protein metabolism in rooted runner bean leaves. *New Phytol.*, (53), 31.

COMBES R., 1935. La nutrition azotée de la fleur. *C. R. Acad. Sci.*, **200**, 1970-1972.

COMBES R., 1936. La nutrition glucidique de la fleur. *C. R. Acad. Sci.*, **203**, 1282-1284.

COORTS G. D., GARTNER J. B., MC COLLUM J. P., 1965. Effect of senescence and preservative on mitochondrial activity in flower petals of Rosa hybrida « *Velvet Times* ». *Proc. amer. Soc. hortic. Sci.*, **89**, 694-701.

CURREY, GEOFFREY S., 1927. Cités par WEINSTEIN. The cause of bluing of roses. *J. Proc. Roy. N. S. Wales*, **61**, 307-314.

DURKIN D., KUC R., 1966. Vascular blockage and senescence of the cut rose flower. *Proc. amer. Soc. hortic. Sci.*, **89**, 683-688.

GESSNER F., 1948. Stoffwänderungen in bestaübten Orchideenblüten. *Biol. Zbl.*, **67**, 457.

HALEVY A. M., MAYAK S., FRUCHTER M., BEN YEHOSHUA S., 1965-66. Studies on postharvest physiology of cut flowers. *Res. Rep. Heb. Univ. Jerusalem*, 563.

MC KEE H. S., 1962. *Nitrogen metabolism in plants*. Clarendon Press, Oxford, 728 p.

KUC S., 1964. Nitrogen and organic acid metabolism of aging *Better Times* roses. *Diss. Abstr.*, **25**, 2696.

LARSEN F. E., CROMARTY R. W., 1967. Microorganism inhibition by 8-hydroxyquinoline citrate as related to cut flower senescence. *Proc. amer. Soc. hortic. Sci.*, **90**, 546-549.

LARSEN F. E., SCHOLES F., 1965. Effect of sucrose, 8-hydroxyquinoline citrate and N-dimethyl aminosuccinamic acid on vase-life and quality of cut carnation. *Proc. amer. Soc. hortic. Sci.*, **87**, 458-463.

LARSEN F. E., SCHOLES F., 1966. Effects of 8-hydroxyquinoline citrate and N-dimethyl aminosuccinamic acid and sucrose on vase-life and spike characteristics of cut snapdragons. *Proc. amer. Soc. hortic. Sci.*, **89**, 694-701.

LOEFFLER J., VAN OVERBEEK J., 1963. Cités par DURKIN et KUC. Kinin activity in Coconut milk. *Colloque intern. C. N. R. S.*, Gif sur Yvette, 77-82.

MARLIN N., ROGERS M., 1963. Flower preservatives and how they work. *Living flowers that last. A national symposium*. Univ. Missouri.

MAROUSKI J., 1969. Vascular blockage, water absorption, stomatal opening and respiration of cut *Better Times* roses treated with 8- hydroxyquinoline citrate and sucrose. *J. Amer. Soc. hortic. Sci.*, **94**, 223-225.

MASTALERZ J., ROGERS M., KRONE P., 1963. *Living flowers that last. A national Symposium*, Univ. Missouri.

MOREL G., 1962. Action d'analogues structuraux des purines sur les processus d'altération des organes végétaux après récolte. *C. R. Congrès intern. Hortic. Bruxelles*, **5**, 334-345.

NICHOLS R., 1964-65., 1965-66, 1966-67. *Ann. Rep. Ditton Laboratory*.

OSBORNE D. J., 1962. Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in *Xanthium* leaves during senescence. *Plant Physiol.*, **37**, 595-602.

OSBORNE D. J., HALLAWAY M., 1964. The auxin 2,4-D as a regulator of proteins synthesis and senescence in detached leaves of *Prunus*. *New Phytol.*, **63**, 334-347.

PAULIN A., 1963. Étude chromatographique des protides des inflorescences d'*Iris germanica*. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **49**, 46-52.

PAULIN A., 1969. Observations complémentaires sur la capacité d'absorption et de synthèse des fleurs d'iris coupées. *Rev. gén. Bot.*, **76**, 581-604.

PAULIN A., ULRICH R., 1962. Observations physiologiques sur les fleurs d'inflorescences isolées d'*Iris germanica*. *Rev. gén. Bot.*, **69**, 369-388.

ROSSETTI V., 1966-67. Gli aminoacidi liberi di alcuni tessuti di *Lilium candidum* (petali, foglie, bulbi e radici) raccolti in diversi periodi di vica vegetativa. *Atti. Accad. Sci. Torino*, (1), 85-98.

SCHOLES J. F., 1963. Cité par MAROUSKY. *Some effects of various chemicals on the postharvest physiology of* Velvet Times *roses*. M. S. Thesis, Cornell Univ., Ithaca, N. Y.

SCHUMACHER W., 1931-32. Cité par CARFANTAN. Über Eiweissumsetzungen im Blütenblättern. *Jb. Wiss. Bot.*, **75**, 581.

SMITH W. H., 1965-66. *Ann. Rep. Ditton Laboratory*.

TAVANT N., 1967. Modifications chimiques accompagnant la sénescence des végétaux supérieurs. *Ann. Sci. Univ. Besançon Bot.*, **4**, 37-43.

THOMPSON J., MORRISON J., 1951. Determination of organic nitrogen. *Anal. Chem.*, **23**, 1151-1157.

TWIGG M. C., 1952. Cité par WEINSTEIN. *Physiological and chemical studies of the keeping quality of the* Better Times *roses*. Ph. D. Thesis, Ohio State Univ., 117 p.

ULRICH R., PAULIN A., 1957. Observations sur les inflorescences isolées d'iris. *Rev. gén. Bot.*, **64**, 93-106.

ULRICH R., PAULIN A., 1966. Capacité d'absorption et de synthèse de fleurs d'iris cueillies et alimentées en glucose. *Rev. gén. Bot.*, **73**, 749-764.

VILLERET S., 1970. L'évolution de l'azote soluble et de sa fraction aminée aux différents stades de développement des fleurs de l'inflorescence d'*Iris pseudacorus* L. *C. R. Acad. Sci.*, **270** (10), 1330-1333.

VILLERET S., 1970. L'évolution des acides aminés libres et peptidiques de l'azote soluble pendant le développement des fleurs d'*Iris pseudacorus L. C. R. Acad. Sci.*, **271** (13), 1090-1093.

WEINSTEIN L. H., 1957. Senescence of roses. 1. Chemical changes associated with senescence of cut *Better Times* roses. *Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant. Res.*, **19**, 33-48.

WEINSTEIN L. H., LAURENCOT H. J., 1963. Studies on the preservation of cut flowers. *Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant Res.*, **22** (2), 81-90.

WILKINS H. F., 1965. Factors affecting carbon dioxide and ethylene gas production in flowers of the carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivar *Red Gayeti*. *Diss. Abstr.*, **26**, 2407-2408.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 305-312.

ÉTUDE DES PRODUITS VOLATILS FORMÉS PAR DÉGRADATION DU GLUCOSE EN PRÉSENCE DE PROLINE

G. BRULÉ, P. DUBOIS et Tzv. OBRETENOV [1]

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches I. N. R. A.,
21 - Dijon

RÉSUMÉ

Une vingtaine de composés volatils, provenant de la dégradation thermique du glucose en présence de proline, ont été identifiés par couplage de chromatographie en phase gazeuse et de spectrométrie de masse. La détermination des seuils de perception a été effectuée sur quelques-uns de ces composés. Les dérivés aux seuils les plus faibles ont des goûts et odeurs caractéristiques des produits de chauffage.

Mots clés : *traitements thermiques, Maillard (réaction de), glucides, produits volatils, spectrométrie de masse.*

INTRODUCTION

Les modifications des caractères organoleptiques qui surviennent à différents stades de fabrication ou au cours du conditionnement de nombreuses denrées alimentaires ont souvent pour origine les traitements thermiques ; c'est le cas notamment des boissons qui doivent être pasteurisées en vue de leur conservation. Il en résulte fréquemment des odeurs et des goûts de « cuit » qui proviennent de la dégradation des sucres réducteurs en présence de protéines ou d'acides aminés.

Ces dégradations ont fait l'objet de nombreux travaux, puisqu'elles sont à l'origine de flaveurs très caractéristiques et très recherchées, telles que celles du caramel, du chocolat, du café, du pain, des cacahuètes... mais aussi de flaveurs très désagréables dans certains cas. Les recherches ont été effectuées en général à partir de solutions modèles de sucres et d'acides aminés, soit séparément, soit en mélange.

Keeney et Day (1957), Ballance (1961) ont décrit les flaveurs obtenues par chauffage de solutions d'acides aminés en présence d'un dérivé dicarbonylé, tel que

[1] Adresse actuelle : Institut supérieur des Industries alimentaires, Chimie organique et Biochimie, Plovdiv (Bulgarie).

l'isatine. Certains des composés volatils qui proviennent dans ce cas de la dégradation de Strecker des acides aminés ont pu être identifiés ; il s'agit principalement d'aldéhydes.

La décomposition thermique des sucres seuls et notamment des hexoses a été étudiée en milieu sec et à des températures variant de 150 à 300°C (NEWTH, 1951 ; GREENWOOD, 1961 ; SUGISAWA, 1966 ; SHAW, 1968 ; WALTER, 1968 ; JOHNSON, 1969).

L'interaction « sucre-acide aminé » a été étudiée dans des conditions très différentes suivant les auteurs (HERZ et SHALLENGER, 1960 ; EL'EODE, 1966 ; ARROYO et LILLARD, 1970). Les résultats varient avec la température et le pH ; mais en général les produits volatils formés proviennent de la dégradation soit de l'acide aminé, soit du sucre. Certains auteurs ont signalé la formation de dérivés du pyrrole et de la pyrazine qui résultent de l'interaction de produits azotés et de sucres réducteurs (KATO, 1968 ; KOELHER, 1969).

Dans l'ensemble, les conditions opératoires utilisées au cours de ces travaux ne sont pas très proches de celles que nous trouvons en technologie alimentaire ; c'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier la dégradation du glucose en présence d'acide aminé dans des conditions voisines de celles de la pasteurisation des jus de fruit, notamment en ce qui concerne la température et le pH.

Pour simplifier l'analyse, nous avons choisi un acide aminé cyclique, la proline, qui, dans les conditions utilisées, ne donne pas de dégradation de Strecker ; cet acide aminé, bien qu'il ne se dégrade pas, réagit avec le sucre pour donner naissance à un composé intermédiaire qui accélère la dégradation du glucide.

MATÉRIEL UTILISÉ ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Chauffage et extraction

On dissout 5 g de DL-proline et 15 g de D-glucose anhydre (Carlo Erba) dans 100 ml d'acide malique 0,1 N (pH 2,5). La solution est placée dans un ballon de 250 ml surmonté d'une colonne à rectifier. Des pièges à glace et à azote liquide retiennent les produits les plus volatils qui peuvent s'échapper de la colonne. Le mélange réactionnel est chauffé à l'aide d'un chauffe-ballon électrique. La température est réglée de façon à ce que l'ensemble des produits volatils soit rectifié dans la colonne ; elle se situe entre 95 et 100°C. Après 24 heures de chauffage, on augmente légèrement la température de façon à ce que les produits volatils et une partie de l'eau (20 ml) passent dans les pièges.

Le distillat est extrait trois fois avec 20 ml d'éther éthylique distillé. Cette phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis concentrée.

Le résidu du mélange réactionnel est alors dilué 30 fois avec de l'eau distillée, puis extrait trois fois avec 50 ml d'éther éthylique. Cette importante dilution est rendue nécessaire pour éviter les émulsions au cours de l'extraction.

Méthode d'analyse

La séparation et l'analyse des composés volatils des deux extraits se font par chromatographie en phase gazeuse et par couplage avec un spectromètre de masse dont les caractéristiques sont indiquées sur le tableau 1. La température est programmée de 50° à 180°C pour l'extrait du distillat et de 100° à 180°C pour l'extrait du résidu.

Tous les composés sont identifiés d'après leur spectre de masse ; puis les spectres et les volumes de rétention sont comparés à ceux des produits de référence. Nous avons synthétisé quelques-uns de ces produits : l'hydroxyméthyl-2 furane a été préparé à partir du furfural suivant la réac-

tion de Cannizaro ; le méthyl-2 furfural et l'hydroxy-4 diméthyl-2-5 furanone- 3(2 H) par chauffage du rhamnose en présence soit d'acide chlorhydrique, soit d'acétate de pipéridine (HODGE, 1963) ; le diformyl-2-5 furane par oxydation nitrique de l'hydroxyméthyl-5 furfural. Les autres produits de référence proviennent du commerce.

TABLEAU I

Conditions de l'analyse des extraits

Chromatographie en phase gazeuse	Spectrométrie de masse
Appareil : Perkin-Elmer-880	Appareil : Varian Mat CH 5
Colonne { Carbowax 20 M 2 p. 100, 12′, 1/8″ }	Séparateur de gaz : Watson-Biemann
	Température source : 250°C
Gaz vecteur : Hélium	Énergie des électrons : 70 eV
Débit : 30 ml/mn	Intensité cathode : 300 μA
Programmation { 50° à 180°C, 100° à 180°C } { 2°C/mn }	

Détermination des seuils de perception

La détermination des seuils de perception a été effectuée à l'aide de la méthode « *duo-trio* ». On soumet à l'appréciation du jury de dégustation 3 lots de 2 échantillons ; dans chacun de ces couples, l'un des échantillons est identique à une référence d'eau minérale et l'autre contient en plus le produit étudié. Le dégustateur doit indiquer pour chacun des lots le numéro de l'échantillon qui est différent de la référence ; les échantillons, de concentrations différentes, sont placés dans un ordre croissant de façon que la dégustation commence par la faible dilution.

Le jury de dégustation est composé d'une quinzaine de personnes du laboratoire ; chaque produit est examiné 2 fois. Sur 30 jugements, on admet que le seuil est significatif à 5 p. 100 lorsque 21 réponses sont correctes (LARMOND, 1969).

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les composés que nous avons identifiés sont mentionnés dans le tableau 2 ; plusieurs d'entre eux ont été signalés dans un certain nombre de travaux sur la dégradation thermique des sucres, mais dans des conditions différentes (QUA, 1964 ; HEYNS, 1966 ; SUGISAWA, 1966 ; WALTER, 1968).

Les chromatogrammes (fig. 1 et 2) obtenus par couplage direct du chromatographe avec le spectromètre de masse montrent l'importance relative des différents composés obtenus. Le diformyl-2-5 furane, dont nous avons représenté le spectre de masse (fig. 3), n'a jamais été signalé à notre connaissance dans les produits de chauffage ; il provient probablement de l'oxydation de l'hydroxyméthyl-5 furfural qui est toujours en quantité très importante. Le méthyl-5 propanedione-2 furane a été identifié seulement d'après son spectre de masse (fig. 3) en tenant compte des fragmentations du propanedione-2 furane (WALTER, 1968). L'hydroxy-4 diméthyl-2-5 furanone-3 (2 H), qui a une odeur de caramel, n'a été signalé qu'une seule fois et dans le cas de la pyrolyse à 500°C du glucose (HEYNS, 1966). Le pic n° 21 dont

TABLEAU 2

Composition analytique des extraits

Pic	Composé	CG	SM	Pic	Composé	CG	SM
1	Formate d'éthyle.....	++	++	12	Méthyl-5 acétyl-2 furane ...		+
2	Acétate d'éthyle	++	++	13	Hydroxyméthyl-2 furane (alcool furfurylique)	++	++
3	Éthanol	++	++	14	Lactone de l'acide hydroxy-4 pentène-2 oïque		+
4	Diacétyle	++	++	15	Propanedione-2 furane	+	+
5	Pentanedione-2, 3.....	++	++	16	Méthyl-3 cyclopentane-dione 1-2	++	++
6	Méthyl-3 pentanone-2..	++	++	17	Hydroxy-4 diméthyl-2-5 furanone-3 (2 H)	++	++
7	Acétol		+	18	Méthyl-5 propanedione-2 furane.....		+
8	Hexène-1 one-3		+	19	Diformyl-2-5 furane	++	++
8a	Acide acétique	++	++	20	Maltol	++	++
9	Furfural	++	++	21	Masse moléculaire 126		
10	Acétyl-2 furane	++	++	22	Masse moléculaire 144		
11	Méthyl-5 furfural.....	++	++	23	Hydroxyméthyl-5 furfural ...	++	++

\+ Identification par spectrométrie de masse seule.
++ Structure confirmée par comparaison avec des produits de référence.

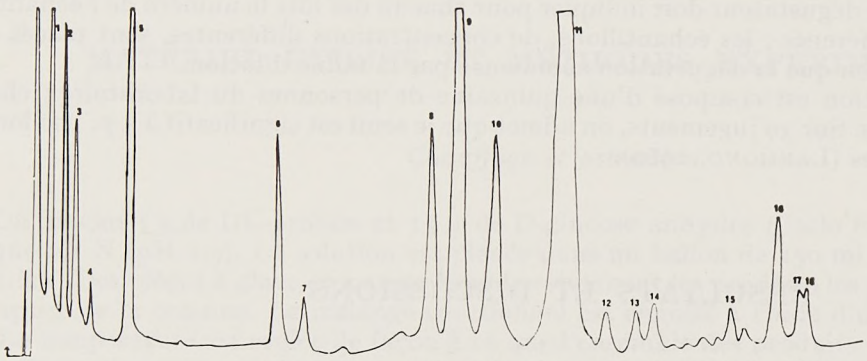


FIG. 1. — *Chromatogramme de l'extrait du distillat*
Température 50 à 180°C, 2°C/mn

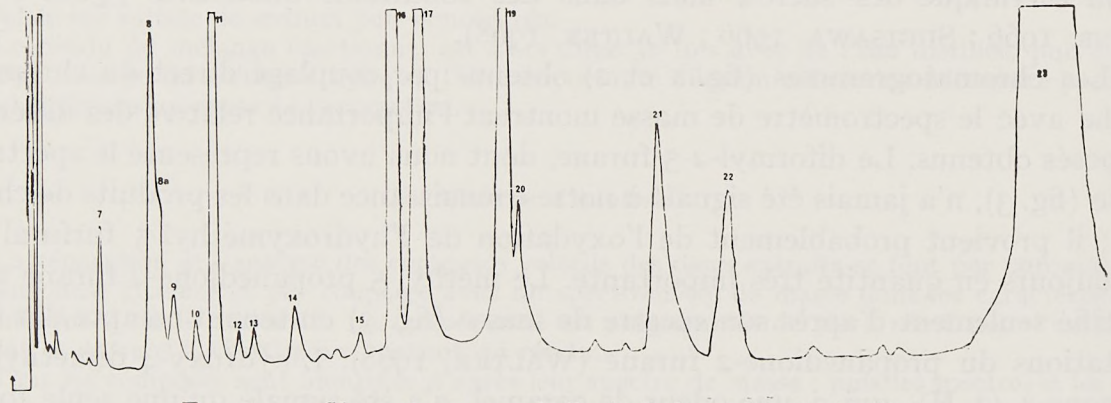


FIG. 2. — *Chromatogramme de l'extrait du résidu de distillation*
Température 100 à 180°C, 2°C/mn

le spectre de masse donne les ions $M^+ = 126$, $(M - 17)^+ = 109$ et $(M - 45)^+ = 81$ pourrait correspondre à un isomère de l'acide méthyl-furoïque ; son volume de rétention est plus faible que celui de l'acide furoïque, ce qui peut s'expliquer par un encombrement stérique et par une liaison hydrogène au niveau de la fonction acide ; cette hypothèse n'a pu être vérifiée.

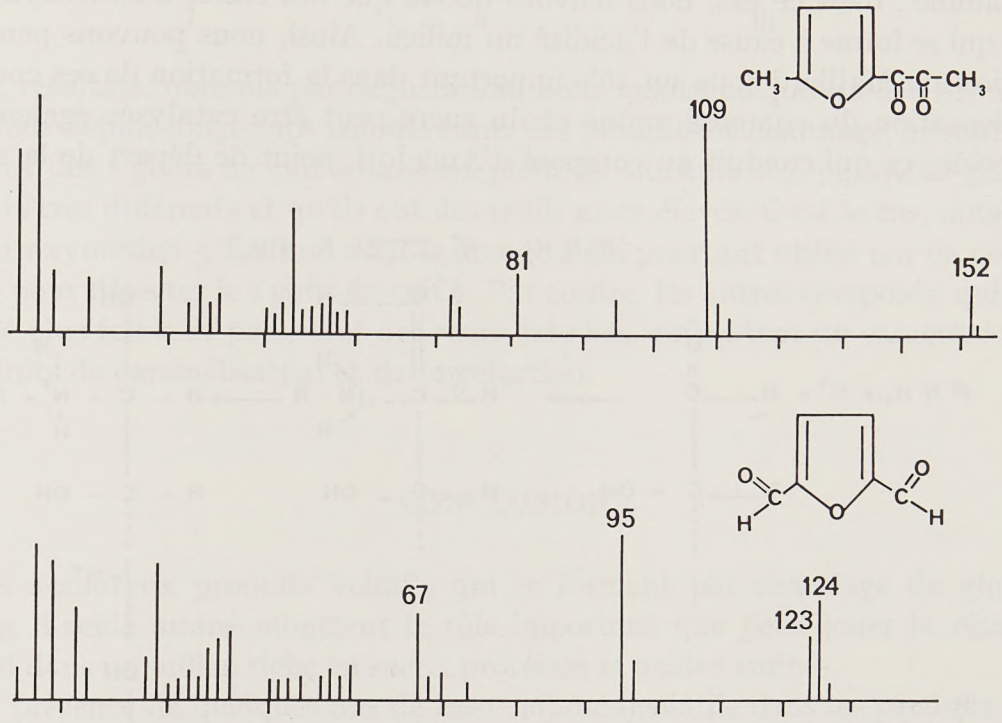


FIG. 3. — *Spectres de masse du méthyl-5 propanedione-2 furane et du diformyl-2-5 furane*

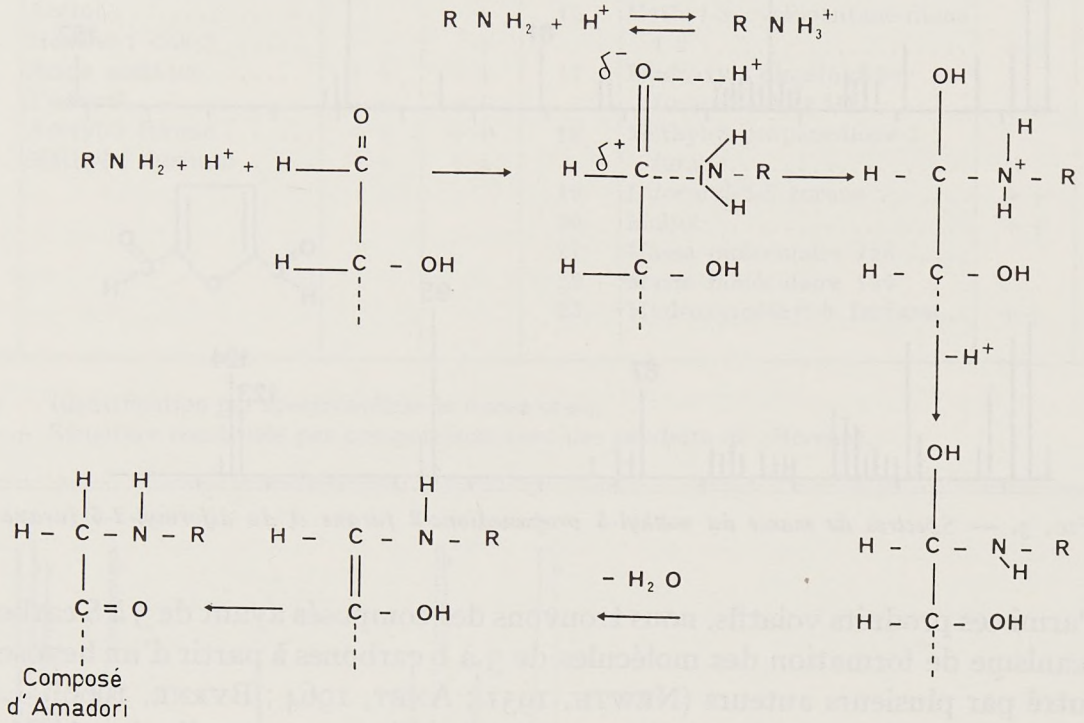
Parmi ces produits volatils, nous trouvons des composés ayant de 3 à 8 carbones ; le mécanisme de formation des molécules de 3 à 6 carbones à partir d'un hexose a été démontré par plusieurs auteurs (NEWTH, 1951 ; ANET, 1964 ; BYRNE, 1966). La formation des composés à 7 et 8 carbones ne peut s'expliquer, comme l'a signalé WALTER (1968), que par réaction secondaire des produits de décomposition du sucre ; c'est pourquoi nous avons pris soin de rectifier les produits volatils au cours du chauffage.

TABLEAU 3

Évaluation des seuils de perception

Nom du composé	Seuil concentration p.p.m.
Furfural	5
Hydroxyméthyl-5 furfural	100
Hydroxyméthyl-2 furane	5
Acétyl-2 furane	80
Maltol	20
Hydroxy-4 diméthyl-2-5 furanone-2 (2 H)	1
Méthyl-3 cyclopentadione-1-2	2
Diformyl-2-5-furane	> 100

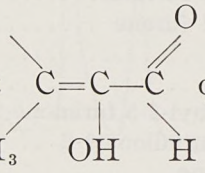
L'origine de l'ensemble de ces produits volatils est très complexe ; comme nous l'avons déjà signalé, il n'y a pas de réaction de Strecker dans ces conditions, puisqu'il s'agit d'un acide aminé cyclique, mais il y a possibilité d'avoir soit une caramélisation du glucose seul en milieu acide, soit une réaction de Maillard avec la proline. Nous avons alors refait la réaction dans les mêmes conditions mais en l'absence d'acide aminé ; dans ce cas, nous n'avons décelé que des traces d'hydroxyméthyl-5 furfural qui se forme à cause de l'acidité du milieu. Ainsi, nous pouvons penser que la réaction de Maillard joue un rôle important dans la formation de ces composés. La condensation du composé aminé et du sucre peut être catalysée également en milieu acide, ce qui conduit au composé d'Amadori, point de départ de la réaction

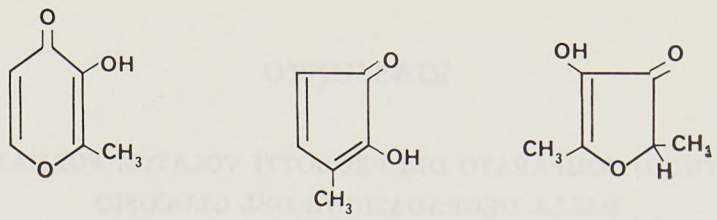


de Maillard ; ce composé favorise les énolisations et les éliminations de la partie glucosique, ce qui conduit à la formation d'un grand nombre de produits volatils.

La majorité de ces produits présente des propriétés organoleptiques très intéressantes. Nous avons déterminé le seuil de perception à la dégustation de quelques produits cycliques en solution aqueuse (tabl. 3).

Les dérivés du furane, comme le furfural, l'hydroxyméthyl-5 furfural, l'acétyl-2 furane, donnent des goûts de moisissures et d'amertume suivant les concentrations ; par contre, l'hydroxyméthyl-2 furane possède un léger goût de viande fumée.

Quant aux autres dérivés comme le maltol (I), le méthyl-3 cyclopentadione-1-2 (II) et l'hydroxy-4 diméthyl-2-5 furanone-2 (2 H) (III), ils ont des odeurs et des goûts qui se rapprochent plus ou moins de ceux du caramel. HODGE (1967) attribue cette similitude aromatique au groupement  qui se trouve dans les trois molécules.



I II III

Ces résultats, obtenus par dégustation, nous montrent que les dérivés du furfural, connus depuis longtemps comme étant des produits de chauffage, ne sont pas responsables des « goûts de cuit » dans les produits alimentaires, puisqu'ils présentent des goûts très différents et qu'ils ont des seuils assez élevés. C'est le cas, notamment, de l'hydroxyméthyl-5 furfural dont le dosage a été pourtant utilisé par de nombreux auteurs pour détecter le « goût de cuit ». Par contre, les autres composés, qui sont en quantité plus faible et possèdent des seuils très bas, présentent un caractère très net de produits de caramélisation et de torréfaction.

CONCLUSION

Les nombreux produits volatils qui se forment par chauffage du glucose en présence d'acide aminé montrent le rôle important que peut jouer la réaction de Maillard dans un milieu riche en sucre, protéines et acides aminés.

La présence de quelques-uns de ces composés volatils dans les produits alimentaires qui ont subi des traitements thermiques modifie sans aucun doute leurs caractères organoleptiques.

Reçu pour publication en octobre 1971.

SUMMARY

STUDY OF THE VOLATILE SUBSTANCES FORMED FROM THE DEGRADATION OF GLUCOSE IN THE PRESENCE OF PROLINE

About twenty volatile compounds resulting from the thermic degradation of glucose in the presence of proline were identified by gas chromatography and mass spectrometry. Perception thresholds of some of these compounds were determined. The substances with the lowest thresholds have the characteristic taste and smell of products of heating.

RESUMEN

ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS VOLÁTILES FORMADOS POR LA DEGRADACIÓN DE LA GLUCOSA EN PRESENCIA DE PROLINA

Unos veinte compuestos volátiles, procedentes de la degradación térmica de la glucosa en presencia de prolina, han podido ser identificados por combinación de la cromatografía en fase gaseosa y la espectrometría de masa. La determinación de los límites de percepción ha sido efectuada respecto a algunos de estos componentes. Los derivados que se sitúan en los límites más inferiores presentan sabores y olores característicos de los productos de calentamiento.

RIASSUNTO

STUDIO COMPARATO DEI PRODOTTI VOLATILI FORMATI DALLA DEGRADAZIONE DEL GLUCOSIO IN PRESENZA DI PROLINA

Una ventina di composti volatili provenienti dalla degradazione termica del glucosio in presenza di prolina, sono stati identificati mediante accoppiamento di cromatografia in fase gassosa e di spectometria di massa. Su alcuni di questi composti sono state determinate le soglie di percezione. I derivati le cui soglie sono più deboli hanno dei gusti e degli odori caratteristici dei prodotti di riscaldamento.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANET E. F., 1964. 3-deoxyglycusuloses (3-deoxyglycosones) and the degradation of carbohydrates. In *Adv. Carbohydr. Chem.* **19** , 181-218. ed. by WOLFROM M. L. and TIPSON R. S., Academic Press, New York.

ARROYO P. T., LILLARD D. A., 1970. Identification of carbonyl and sulfur compounds from non enzymatic browning reactions of glucose and sulphur containing amino acids. *J. Food. Sci.*, **35**, 769-776.

BALLANCE P. E., 1961. Production of the volatile compounds related to the flavor from the Strecker degradation of D.L-methionine. *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 532.

BARNES H. M., KAUFMAN W., 1947. Industrial aspect of browning reaction. *Industr. engng. Chem.*, **39**, 1167.

BYRNE G. A., GARDINER D., HOLMES F. M., 1966. The pyrolisis of cellulose and the reaction of flame retardants. II. Further analysis and identification of products. *J. appl. Chem.*, **16**, 81-88.

EL'EODE K. E., DORNSEIFER P. D., KEITH E. S., POWERS J., 1966. Effect of pH and temperature on the carbonyls and aromas produced in heated amino acid sugar mixtures. *J. Food. Sci.*, **31**, 351-357.

GREENWOOD C. T., KNOX J. H., MILNE, E., 1961. Analysis of the thermal decomposition products of carbohydrates by gas chromatography. *Chem. and Industry*, 1878-1879.

HERZ W. J., SHALLENGER R. S., 1960. Some aromas produced by simple amino acid-sugar reactions. *Food. Res.*, **25**, 491-494.

HEYNS K., STUTE R., PAULSEN H., 1966 Braunungsreaktionen und Fragmentierungen von Kohlenhydraten. *Carbohydr. Res.*, **2**, 132-149.

HODGE J. E., 1967. Origin of flavor in food : non enzymatic browning reactions. In *The chemistry and physiology of flavors*, 465-485. Ed. H. W. SCHULTZ. The AVI Publishing Co, Westport, Connecticut.

HODGE J. E., FISCHER B. E., 1963. *Structure of a pseudo reductone from L-rhamnose.* Abstracts of papers, 145th Meeting. Ann. Chem. Soc. September.

JOHNSON R. R., ALFORD E. D., KINZER G. W., 1969. Formation of sucrose pyrolysis products. *J. agric. Food Chem.*, **17** (1), 22-24.

KATO H., FUJIMAKI M., 1968. Formation of N-substitued pyrrole-2 aldehydes in the browning reaction between D-xylose and amino compounds. *J. Food. Sci.*, **33** (5), 445-449.

KOELHER P. E., MASSON M. E., NEWELL J. A., 1969. Formation of pyrazine compounds in sugar aminoacid model sytems. *J. agric. Food. Chem.*, **17** (2), 393-396.

KEENEY M., DAY E. A., 1957. Probable role of Strecker degradation of amino acids in the development of cheese flavor. *J. dairy Sci.*, **40**, 875-876.

LARMOND E., 1969. *Méthodes d'appréciation sensorielle des aliments.* Publication n° 1284. Ministère de l'Agriculture du Canada.

NEWTH F. M., 1951. The formation of furan compounds from hexose. In *Adv. Carbohydr. Chem.*, **6** , 83-106. Ed. HUDSON C. S. and CANTOR S. M., Academic Press, New York.

QUA A. Y., FAGERSON I. S., 1964. *Evolution of volatiles from heated corn hydrolyzates.* Presented at the 24th annual meeting of the institute of food technologists. Washington.

SHAW P., TATSUM J., BERRY R., 1968. Base catalyzed fructose degradation and its relation to non enzymatic browning. *J. agric. Food Chem.*, **16** (6), 979-982.

SUGISAWA H., 1966. The thermal degradation of sugars. II. The volatile decomposition products of glucose caramel. *J. Food. Sci.*, **31**, 381-385.

WALTER R. H., FAGERSON I. S., 1968. Volatile compounds from heated glucose. *J. Food Sci.*, **33**, 294-297.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 313-322.

MODIFICATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DES PHOSPHOLIPIDES D'UN LAIT CRU DE VACHE AU COURS DU STOCKAGE

J. MATHELIN, J. CLÉMENT et V. CAUMARTIN

Laboratoire de Physiologie de la Nutrition,
Faculté des Sciences,
21 - Dijon

Laboratoire de Microbiologie, I. B. A. N. A.,
21 - Dijon

RÉSUMÉ

Cette étude apporte des données sur les modifications quantitatives et qualitatives des phospholipides d'un lait cru de vache, au cours d'un stockage de 24 heures à 4°C et 20°C. Les analyses ont porté d'une part sur la crème, d'autre part sur le lait écrémé sous-nageant, après séparation par centrifugation. Les lipides ont été extraits à froid par un mélange de solvants (méthylal-méthanol). Les phospholipides ont été séparés des lipides non phosphorés par adsorption sur acide silicique ; les différentes catégories de ces constituants ont été séparées par chromatographie combinée sur colonne et sur couche mince, leur évaluation étant basée sur leur teneur en phosphore. Les acides gras ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Dans le lait cru analysé aussitôt après la traite, la composition en phospholipides trouvée est en accord avec celle rapportée par divers auteurs : les phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines sont les constituants majeurs ; les phosphatidylinositols, polyglycérophosphatides, sphingomyélines et phosphatidylsérines sont beaucoup moins représentés.

Lors du stockage à 4°C, on note un enrichissement en phospholipides de la crème, aux dépens du lait écrémé sous-nageant, la totalité des phospholipides dans les deux phases réunies restant constante. Par contre, lors du stockage à 20°C, on observe une forte augmentation de la quantité des phospholipides — en particulier dans la crème — et des modifications dans leur répartition ; la synthèse de ces constituants pourrait être due à la présence de la microflore. Le degré de saturation des phospholipides est augmenté quelle que soit la température de stockage.

Mots clés : *lait de vache, phospholipides, stockage.*

INTRODUCTION

Bien que les lipides phosphorés soient en très faibles proportions dans le lait (de l'ordre de 0,5 p. 100), il est reconnu que ces constituants jouent un rôle non négligeable dans le lait et les produits laitiers ; ils sont en particulier quantitativement

importants dans le sérum du lait et dans la membrane lipoprotéique des globules gras (MULDER *et al.*, 1957 ; MORRISON *et al.*, 1965). Quelques travaux ont montré qu'ils influent sur les propriétés organoleptiques du lait et de ses dérivés et sur la stabilité de la matière grasse à l'égard de l'oxydation durant les différents traitements industriels et le stockage (SWARTLING et MATTSON, 1961 ; SMITH et LOWRY, 1962 ; WALSTRA et DE GRAAF, 1962 ; MATTSON et SWARTLING, 1963).

On trouve de nombreuses études sur la composition phospholipidique du lait de vache ou sur celle de différentes fractions du lait : crème, babeurre, beurre, petit lait. Tous les auteurs s'accordent pour trouver trois constituants principaux : céphalines à éthanolamine, lécithines et sphingomyélines (SMITH et LOWRY, 1962 ; HAWKE, 1963 ; PATTON *et al.*, 1964 ; MORRISON *et al.*, 1965 ; MOORE *et al.*, 1968). Certains notent aussi la présence de fractions mineures : plasmalogènes, céphalines à inositol et cérébrosides (HAWKE, 1963 ; GALANOS et KAPOULAS, 1965).

Quelques travaux ont trait à l'influence de certains traitements industriels de conservation (SWARTLING et MATTSON, 1961 ; WILLART, 1964 ; SPRECHER *et al.*, 1965) ou à l'influence du vieillissement lors du stockage (SPRECHER *et al.*, 1965) sur la répartition des phospholipides et leur composition en acides gras. Pour SWARTLING et MATTSON (1961), la dégradation des phospholipides serait à l'origine du rancissement du lait frais, du lait en poudre et du beurre.

D'après SPRECHER *et al.* (1965), le rancissement n'entraîne pas une oxydation des acides gras des phospholipides mais des modifications quantitatives de ces constituants. RAWAT (1963) signale la diminution du taux des phospholipides lors du stockage du beurre.

Comme toutes ces études ont porté sur des laits ou des produits laitiers stockés pendant des périodes relativement longues, nous avons voulu déterminer dans ce travail les modifications quantitatives et qualitatives des phospholipides au cours d'un stockage de 24 heures à deux températures, 4°C et 20°C, à l'instar de ce qui se produit couramment ; nous avons en outre essayé de trouver une explication à ces modifications.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Du lait entier est obtenu après la traite du matin d'une seule vache dans une ferme des environs de Dijon. Il est recueilli dans un récipient en verre non stérile et transporté à température ordinaire, la durée du transport étant égale à 15 mn environ ; il est ensuite conservé à 4°C pendant 45 mn environ avant d'être analysé. Après une courte agitation du lait pour le rendre homogène, on prélève trois échantillons de 250 ml, A, B et C.

L'échantillon A est immédiatement analysé ; les échantillons B et C sont mis dans des béchers fermés par une feuille de papier et sont laissés 24 heures à 4°C ou 20°C.

On sépare facilement la crème du lait sous-nageant par centrifugation à 6 000 tr/mn pendant 10 mn dans une centrifugeuse JOUAN, modèle E 57.

Extraction des lipides et séparation des phospholipides

Les lipides des deux phases (crème et lait écrémé) sont extraits à température ambiante par addition de 10 à 12 volumes d'un mélange méthylal-méthanol (4/1, v/v). Après 24 heures de contact, on filtre sur papier en rinçant abondamment par le même mélange de solvants, puis par du méthylal pur. On concentre alors l'extrait lipidique à une température inférieure à 50°C, puis on transvase dans une ampoule à décanter et on ajoute du chloroforme à raison de 8 volumes

pour 1 volume d'extrait. Après agitation et décantation pendant une nuit en chambre froide, on prélève la phase chloroformique. On renouvelle deux fois l'extraction au chloroforme.

Les phases chloroformiques sont réunies et concentrées. On élimine la majeure partie des glycolipides selon la méthode de MASORO (1964). Sur des parties aliquotes de l'extrait lipidique purifié, on détermine le phosphore lipidique total et la quantité de lipides totaux ; la majeure partie est utilisée pour séparer les différents constituants lipidiques.

Nous avons renoncé à séparer les lipides sur colonne directement à partir de l'extrait lipidique total : comme les lipides non phosphorés (en particulier dans la crème) sont en proportions très élevées, l'opération était très longue et on observait fréquemment une hydrolyse importante des phospholipides. Nous avons préféré adsorber sur acide silicique les phospholipides présents dans l'extrait lipidique purifié en solution dans le chloroforme en adoptant la technique suivante : à 500 ml de solution chloroformique contenant 10 à 15 g de lipides, on ajoute 4 g d'acide silicique qui a été préalablement activé à 130°C pendant une nuit. Après un contact d'une heure, on filtre sur papier et on rince avec du chloroforme. Dans ces conditions, les phospholipides restent adsorbés sur l'acide silicique (nous avons vérifié que dans le chloroforme il ne restait que des traces de phosphore lipidique) ; on élue alors les constituants par du méthanol. La solution méthanolique est évaporée et les phospholipides sont repris par du chloroforme RP ; on sépare, à l'aide d'un collecteur de fractions, les différents phospholipides sur colonne d'acide silicique selon la technique de CLÉMENT et DI COSTANZO (1963) ; chaque fraction éluée de la colonne est identifiée par chromatographie sur couches minces. Les divers phospholipides sont évalués par leur teneur en phosphore.

L'analyse des acides gras est faite par chromatographie en phase gazeuse des esters butyliques selon la technique de CLÉMENT et BÉZARD (1961).

Un lait stérilisé du commerce et des laits préparés industriellement (lait concentré entier non sucré, lait en poudre entier) ont été soumis aux mêmes analyses pour déterminer les quantités de phospholipides qu'ils renferment.

RÉSULTATS

Le lait de ferme que nous avons analysé (à plusieurs reprises au cours de deux années) avait une teneur en lipides totaux voisine de 40 g/l, présentant des fluctuations selon les époques de l'année de + ou — 2 g. L'extraction des lipides étant effectuée dans un délai d'une heure après la traite, la teneur moyenne en phospholipides totaux était de 150 mg/l, répartis ainsi : 60 mg dans la crème et 90 mg dans le lait écrémé.

Dans le tableau 1 sont rassemblées les quantités et la répartition des phospholipides présents dans la crème et le lait écrémé des échantillons A, B et C. On voit qu'en valeur absolue les phospholipides totaux (crème + lait écrémé) sont augmentés dans l'échantillon conservé à 20°C de 14 p. 100 environ. Cette augmentation ne serait pas significative étant donné l'approximation des résultats, mais comme elle porte exclusivement sur la crème et atteint 80 p. 100 dans cette phase, on peut prendre en considération ce fait, d'autant plus que des analyses complémentaires faites exclusivement sur la crème ont permis de le confirmer.

Si l'on examine les phospholipides totaux de chacune des deux phases, crème et lait écrémé, on constate, dans les échantillons B et C par rapport à l'échantillon A, qu'il y a appauvrissement en ces constituants au profit de la crème.

Dans les trois échantillons, les constituants majeurs sont les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines ; viennent ensuite les sphingomyélines, les autres types de phospholipides étant peu représentés. Le stockage du lait à 4°C et 20°C entraîne des modifications dans la répartition des phospholipides : on remarque principalement dans l'échantillon C une forte proportion de polyglycérophosphatides

TABLEAU I

Phospholipides de la crème et du lait écrémé sous-nageant

	1 h après la traite				Après 24 h à 4°C				Après 24 h à 20°C			
	Crème		Lait écrémé		Crème		Lait écrémé		Crème		Lait écrémé	
	mg	p. 100	mg	p. 100	mg	p. 100	mg	p. 100	mg	p. 100	mg	p. 100
Totaux	60	100	90	100	80	100	65	100	110	100	65	100
Polyglycérophosphatides	1,7	2,8	4,5	5	2,3	2,9	2,6	4	1,3	1,4	8,5	12,7
Phosphatidyléthanolamines + phosphatidylsérines	23,5	39,2	24,7	27,5	26,1	32,7	26	40	36,7	33,4	16,2	25
Phosphatidylinositols	2,5	4,2	3,8	4,2	0,7	0,9	1,9	3	0	0	0	0
Phosphatidylcholines	22	36,8	39,1	43,5	34,9	43,6	27	41,5	43,2	39,3	26,2	40,3
Sphingomyélines	10,2	17	17,8	19,8	15,2	19	7,5	11,5	25,9	23,6	13	20
Lysolécithines	0	0	0	0	0,8	0,9	0	0	2,5	2,3	1,3	2

Les quantités de phospholipides sont calculées en multipliant les quantités de phosphore par 25 et sont rapportées au litre de lait. Les chiffres sont des moyennes obtenues à partir de 3 analyses ; les écarts autour de la moyenne n'excèdent pas 7 p. 100.

TABLEAU 2

Composition en acides gras (p. 100 en moles) *des phospholipides totaux présents dans la crème isolée à partir des 3 échantillons de lait A, B et C*

Échantillon	Poids d'acides gras (mg)	Pourcentage en moles des différents acides gras										
		12 : 0	14 : 0	16 : 0	16 : 1	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	Ac. gras > 18 C	Ac. gras saturés	Ac. gras insaturés
1 heure après la traite (A)	40	1,4	3,4	29	6	7,2	36,3	11,6	—	4,6	42	58
Après 24 heures à 4°C (B)	54	2,6	4,6	41	4,7	7,8	27	8	1	3,3	56	44
Après 24 heures à 20°C (C)	74	2,1	6	44,7	5,9	9,7	24,6	5,8	—	1,2	63	37

dans le lait écrémé et, dans les deux phases, l'absence de phosphatidylinositols et par contre la présence de lysolécithines.

On a séparé dans le lait frais les phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines sur plaques basiques en utilisant le milieu de développement suivant : $CHCl_3/CH_3OH/NH_4OH$ 7N, 230/90/15 (STAHL, 1959) ; les phosphatidylsérines représentaient 18 p. 100 de l'ensemble de ces céphalines.

Nous avons eu la curiosité d'analyser les phospholipides de plusieurs échantillons de lait ayant subi des traitements industriels et nous avons trouvé pour certains échantillons de lait en poudre entier et de lait concentré non sucré des valeurs variant entre 150 et 190 mg de phospholipides par litre de lait ; la valeur la plus élevée est voisine de celle que nous observons dans les expériences relatées ici quand la température de stockage est 20°C.

On a établi la composition en acides gras des phospholipides totaux de la crème (tabl. 2) isolée à partir des 3 échantillons de lait, puisque c'est dans cette phase que les modifications des phospholipides sont les plus importantes. On note qu'il n'y a pas d'acides gras à chaînes inférieures à 12 atomes de carbone ; les acides majeurs sont les acides oléique et palmitique. Au cours du stockage, le degré de saturation des acides gras augmente : augmentation du taux des acides palmitique et stéarique, diminution du taux des acides oléique et linoléique.

DISCUSSION

1. — *Les phospholipides du lait fraîchement trait*

Les quantités de phospholipides que nous trouvons par litre de lait frais sont en général plus faibles que celles observées par plusieurs auteurs : 300 mg selon RAWAT (1963) ; précisons toutefois que des dosages de phosphore lipidique sur l'extrait lipidique total non purifié nous donnent des chiffres proches de ceux rapportés par ces auteurs. La différence entre ces valeurs déjà publiées et les nôtres serait donc due, pensons-nous, à la purification que nous effectuons sur l'extrait lipidique. En effet, nous avons vérifié dans des expériences complémentaires que la technique de MASORO (1964), utilisée pour éliminer les glycolipides, ne provoque pas une hydrolyse des phospholipides du lait, ni n'entraîne ceux-ci dans la solution de KCl utilisée pour le lavage de l'extrait chloroformique brut : cette solution pourrait dissoudre des esters phosphoriques hydrosolubles adsorbés primitivement sur les lipides. Il ne nous semble pas que la technique d'extraction des lipides soit en cause ; évitant tout chauffage et par là même empêchant l'hydrolyse des phospholipides, elle semble bien adaptée pour réaliser cette étude, d'autant plus qu'il est bien établi par ailleurs que l'extraction des lipides par cette méthode est totale.

La répartition des phospholipides que nous avons trouvée est en accord dans les grandes lignes avec celle rapportée par nos devanciers (GALANOS et KAPOULAS, 1962 ; SPRECHER, 1964 ; MORRISON, 1968) : phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines sont les constituants majeurs. Comme plusieurs auteurs, nous notons une proportion non négligeable de phosphatidylinositols (GALANOS et KAPOULAS, 1962 ; MORRISON, 1968) et de polyglycérophosphatides (GALANOS et KAPOULAS,

1962) ; par contre, les valeurs de sphingomyélines que nous observons pour le lait entier (18 p. 100 environ) sont plus faibles que celles indiquées par SMITH (1959) et SPRECHER (1964), 23 et 26 p. 100 respectivement ; la proportion de phosphatidylsérines (6 p. 100 pour le lait entier) est plus élevée que celle indiquée par MORRISON (1967, 3 p. 100) et est du même ordre que celle rapportée par MOORE *et al.* (1968).

La composition en acides gras des phospholipides du lait frais est très voisine de celle observée par plusieurs auteurs (BADINGS, 1962 ; SMITH et LOWRY, 1962 ; SPRECHER *et al.*, 1965).

2. — *Effets du stockage à 4°C et 20°C pendant 24 heures*

Ce stockage a pour effet, d'une part, un transfert de phospholipides du lait vers la crème quelle que soit la température et, d'autre part, des modifications dans la répartition des différents phospholipides ; c'est ainsi qu'il y a hydrolyse des phosphatidylinositols, synthèse de sphingomyélines, de polyglycérophosphatides et, à un moindre degré, de phosphatidylcholines et aussi apparition de lysolécithines.

Les changements de composition en acides gras des phospholipides constatés à 4°C et à 20°C peuvent résulter du transfert des constituants les plus saturés du lait écrémé vers la crème.

Les modifications relatives à la composition des phospholipides et à celle de leurs acides gras peuvent être dues à la présence d'enzymes dans le lait cru. Plusieurs auteurs ont signalé l'existence de nombreuses enzymes dans un tel lait (SHAHANI, 1965 ; KITCHEN *et al.*, 1970) ; en particulier KEENAN et COLENBRANDER (1969) ont montré dans du lait de truie la présence d'enzymes capables de synthétiser des triglycérides ; AL-SHABIBI et TOBIAS (1968) ont observé une incorporation d'acides gras à longues chaînes dans les phospholipides de lait cru au cours d'une incubation de 24 heures, mais jusqu'alors aucun auteur n'a indiqué la présence d'enzymes responsables de la synthèse de phospholipides dans le lait. Les différents auteurs qui se sont intéressés aux enzymes du lait pensent qu'elles ont pour principale origine des cellules épithéliales de la glande mammaire.

Il ne faut pas cependant exclure la présence dans le lait cru d'une microflore, laquelle par ses enzymes et ses cellules pourrait expliquer cette synthèse de phospholipides et la saturation des acides gras. Nous avons tenté de préciser le rôle éventuel de ces microorganismes en effectuant quelques expériences complémentaires. Après s'être assuré que la quantité et la qualité des phospholipides d'un lait stérilisé du commerce étaient identiques avant et après incubation 24 heures à 20°C, nous avons ensemencé 250 ml de ce lait stérilisé avec 10 ml de lait cru ayant séjourné préalablement à 20°C pendant 24 heures ; après incubation 24 heures à 20°C de ce mélange, la quantité de phospholipides passe de 147 à 205 mg/l de lait et les céphalines totales, les phosphatidylcholines et surtout les sphingomyélines augmentent. Ces derniers résultats seraient en faveur de l'hypothèse que la synthèse des phospholipides du lait cru serait due aux microorganismes qu'il contient et non à l'existence d'enzymes propres au lait ; en effet dans nos conditions expérimentales, les enzymes susceptibles d'être apportées par le lait cru auraient été sans doute peu actives étant donné leur dilution importante par un grand volume de lait stérilisé.

CONCLUSION

Il apparaît donc qu'au cours du stockage du lait entier cru, il se produit une synthèse de phospholipides, en particulier de sphingomyélines. Ces faits peuvent expliquer, pensons-nous, que les chiffres de phospholipides que nous trouvons dans un lait fraîchement trait soient plus faibles que ceux rapportés par d'autres auteurs ; il est donc possible qu'au cours du ramassage et du transport du lait une synthèse plus ou moins importante de phospholipides se produise, selon la richesse du lait en microorganismes et peut-être en enzymes.

Reçu pour publication en novembre 1971.

SUMMARY

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE MODIFICATIONS OF THE FRESH COW MILK PHOSPHOLIPIDS DURING STORAGE

The purpose of this study is to give some results on the quantitative and qualitative modifications of the fresh cow milk phospholipids, during a 24 hours storage at 4°C and 20°C. The analysis were performed on the cream and on the skim milk, after separating by centrifugation. The lipids were extracted with a solvent mixture (dimethoxymethane-methanol) at room temperature. The phospholipids were separated from the nonphosphorus lipids by adsorption on silicic acid ; the different classes of these constituents were separated by column and thin-layer chromatography and were determined by their phosphorus content. The fatty acids were separated by gas-liquid chromatography.

In fresh milk, immediately analyzed after milking, the phospholipidic composition is in agreement with that reported by different authors : phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines are the most important constituents ; phosphatidylinositols, polyglycerophosphatides, sphingomyelins and phosphatidylserines are minor constituents.

During the storage at 4°C, total phospholipids in the cream increased, at the expense of the skim milk, the whole of phospholipids in the total milk being constant. On the other hand, during storage at 20°C, a high increase of the total phospholipids occured — particularly in the cream — and the distribution of these components was modified. The synthesis of these phospholipids would be caused by microorganisms. The degree of saturation of the phospholipids increased whatever the temperature of storage.

ZUSAMMENFASSUNG

QUANTITATIVE UND QUALITATIVE VERÄNDERUNGEN DER PHOSPHOLIPIDE VON ROHER KUHMILCH WÄHREND DER LAGERUNG

Vorliegende Studie bringt Angaben über die quantitativen und qualitativen Veränderungen der Phospholipide von roher Kuhmilch, bei 24-stündiger Lagerung bei 4°C und 20°C. Die Analysen betrafen einerseits den Rahm, andererseits die sich darunter befindliche entrahmte Milch, nach Abscheidung durch die Zentrifuge. Die Lipide wurden in der Kälte durch ein Lösungsmittelgemisch (Methylal — Methanol) ausgezogen. Die Phospholipide wurden von den nicht phosphorhaltigen Lipiden durch Adsorption an Kieselsäure-Gel getrennt. Die verschiedenen

Kategorien dieser Bestandteile wurden durch die Kombination von Säulenchromatographie und Dünnschichtchromatographie getrennt, wobei sich die Auswertung auf den Phosphorgehalt stützte. Die Fettsäuren wurden durch Gaschromatographie analysiert.

In sofort nach dem Melken analysierter Rohmilch stand die gefundene Zusammensetzung an Phospholipiden im Einklang mit der von verschiedenen Autoren angegebenen Zusammensetzung : Phosphatidyl-Choline und Phosphatidyl-Äthanolamine sind die Hauptbestandteile ; die Phosphatidyl-Inositole, Polyglyzerophosphatide, Sphingomyeline- und Phosphatidyl-Serine sind weit weniger vertreten.

Bei Lagerung bei 4°C wurde eine Anreicherung des Rahms an Phospholipiden, auf kosten der darunterliegenden abgerahmten Milch festgestellts, wobei die Gesamtmenge der Phospholipide in den beiden vereinigten Phasen konstant bleibt. Andererseits wurde bei Lagerung bei 20°C eine starke Zunahme der Phospholipidmenge beobachtet — insbesondere im Rahm — sowie Veränderingen in ihrer Verteilung ; die Synthese dieser Bestandteile dürfte auf die vorhandene Mikroflora zurüchzuführen sein. Der Sättigungsgrad an Phospholipiden erhöhte sich unabhängig von der Lagerungs-temperatur.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AL-SHABIBI M. M. A., TOBIAS J., 1968. Uptake of labeled long chain fatty acids *in vivo* and *in vitro* by different phospholipids in milk. *J. dairy Sci.*, **52** (2), 146-151.

BADINGS H. T., 1962. Fatty acid composition of cow milk phospholipids as determined by gas chromatography and thin-layer chromatography. *Netherl. Milk Dairy J.*, **16**, 217-225.

CLÉMENT G., BÉZARD J., 1961. Technique de dosage par chromatographie gaz-liquide d'un mélange d'acides gras, du butanoïque au docosanoïque. *C. R. Acad. Sci.*, **253**, 564-566.

CLÉMENT J., DI COSTANZO G., 1963. Séparation chromatographique, identification et analyse des phospholipides de la muqueuse intestinale de Rat à jeun. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **45**, 127.

GALANOS D. S., KAPOULAS V. M., 1962. Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures. *J. lipid. Res.* **3**, 134.

GALANOS D. S., KAPOULAS V. M., 1965. Preparation and analysis of lipid extracts from milk and other tissues. *Biochim. biophys. Acta*, **98**, 278-292.

HAWKE J. C., 1963. The distribution of fatty acids between the α'- and β-positions of the glycerophospholipids of buttermilk. *J. Lipid Res*, **4** (3), 255-259.

KEENAN T. W., COLENBRANDER V. F., 1969. Biosynthesis of glycerides in freshly secreted cow's milk. *Lipids*, **4** (2), 168-170.

KITCHEN B. J., TAYLOR G. C., WHITE I. C., 1970. Milk enzymes, their distribution and activity. *J. dairy Res.*, **37**, 279-288.

MASORO E. J., ROWELL L. B., MAC DONALD R. M., 1964. Skeletal muscle lipids. I. Analytical method and composition of monkey *gastrocnemius* and *soleus* muscles. *Biochim. biophys. Acta*, **84**, 493-506.

MATTSON S., SWARTLING P., 1963. Oxydation of milk phospholipids. *Milk dairy Res.*, **68**, 23.

MOORE G. M., RATTRAY J. B. M., IRVINE D. M., 1968. Composition of milk cephalins. *Canad. J. Biochem.*, **46**, 205.

MORRISON W. R., 1968. The distribution of phospholipids in some mammalian milks. *Lipids*, **3**, 101-103.

MORRISON W. R., SMITH L. M., 1967. Fatty acid composition of milk phospholipids. II. Sheep, Indian Buffalo and human milk. *Lipids*, **2**, 178-182.

MORRISON W. R., JACK E. L., SMITH L. M., 1965. Fatty acids of bovine milk glycolipids and phospholipids and their specific distribution in the diacylglycerophospholipids. *J. amer. Oil chemists' Soc.*, **42**, 1142-1147.

MULDER H., MENGER J. W., KOOPS J., 1957. The surface layers of milk fat globules. II. The phospholipids content of the surface layers. *Netherl. Milk Dairy J.*, **11**, 263-269.

PATTON S., DURDAN A., MC CARTHY R. D., 1964. Structure and synthesis of milk fat. VI. Unity of the phospholipids in milk. *J. dairy Sci.*, **47**, 489-495.

RAWAT R. S., 1963. The variations in the phospholipids of milk and their partition in milk products. *Agra. Univ. J. Res.*, **12** (2), 245-250.

SHAHANI K. M., 1965. Milk enzymes : their role and significance. *J. dairy Sci.*, **49** (8), 907-920.

SMITH L. M., FREEMAN N. K., 1959. Analysis of milk phospholipids by chromatography and infrared spectrophotometry. *J. dairy Sci.*, **42** (9), 1450-1462.

SMITH L. M., LOWRY R. R., 1962. Fatty acid composition of the phospholipids and other lipids in milk. *J. dairy Sci.*, **45** (5), 581-588.

SPRECHER H. W., 1964. Isolation and characterization of milk phospholipids. *Diss. Abstr.*, **24**, 3530.

SPRECHER H. W., STRONG F. M., SWANSON A. M., 1965. Phospholipids of fresh milk and of sterile whole milk concentrate. *J. agric. Food Chem.*, **13** (1), 17-21.

STAHL E., 1959. Thin layer chromatography. IV. Scheme, border effect, acidic and basic layers, step-technique. *Arch. Pharm.*, **292**, 411-416.

STAHL A., SCHROTER G., KRAFT G., RENZ R., 1956. Thin layer chromatography (the method, affecting factors, and a few examples of application). *Pharmazie*, **11**, 633.

SWARTLING P., MATTSON S., 1961. Phospholipids and their oxydation. *Rapp. nord. Fettharsknongs-symp.*, 3, *Sandefjord, Norway*, 25-38.

WALSTRA P., DE GRAAF I. J., 1962. Determination of the phospholipids content of milk products. *Netherl. Milk Dairy J.*, **16**, 283-287.

WILLART S., 1964. Effect of freezing on lipolysis in crude milk. *Svenska Mejeritidu*, **56** (18), 241-248.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 323-333.

ÉTUDE COMPARÉE DES ANTIGÈNES DE SEPT LEVURES DE VINIFICATION PAR AGGLUTINATION ET IMMUNOFLUORESCENCE

Claudine CHARPENTIER, P. ISOARD, J. BERGERET et R. FONTANGES

Laboratoire des Fermentations, I. B. A. N. A.,
Campus universitaire, 21 - Dijon

Division de Microbiologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées,
108, Boulevard Pinel, 69 - Lyon 3e

RÉSUMÉ

A l'aide de sérums monospécifiques et de deux techniques sérologiques, l'agglutination et l'immunofluorescence, les auteurs ont montré l'existence de parentés antigéniques entre sept levures de vinification. *Rhodotorula glutinis* n'est pas agglutinée par le sérum homologue, particularité liée peut-être à la composition chimique de la paroi de cette levure.

Mots clés : *antigènes, immunofluorescence, levures, séro-agglutination, vinification.*

INTRODUCTION

L'étude de la structure antigénique des levures pathogènes, représentées essentiellement par le genre *Candida*, a fait l'objet de nombreux travaux parmi lesquels nous pouvons citer ceux de Biguet *et al.* (1961), Rimbaud, Bastide et Nakam (1966), Berchev et Ismirov (1967), Coudert *et al.* (1968). Il n'en est pas de même pour les genres auxquels appartiennent la majorité des levures de vinification. Pour ces dernières, des classifications ont cependant été réalisées par Tsuchiya *et al.* (1957, 1960, 1961) à l'aide d'une seule technique sérologique, l'agglutination sur lame ; les réactions étaient pratiquées avec des sérums anti *C. albicans*.

Les levures de vinification, bien étudiées du point de vue écologique par Domercq (1957), Castelli et Inigo Leal (1958) et Benda (1964), interviennent dans un ordre bien défini au cours du processus de vinification, quels qu'en soient le mode et le lieu.

Nous avons voulu tenter d'expliquer ce phénomène en recherchant au cours de ce travail s'il existait des parentés antigéniques entre sept souches de levures. Nous avons utilisé des sérums monospécifiques et parallèlement deux techniques : l'agglutination et l'immunofluorescence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les différentes souches de levures utilisées

Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoïdeus, Saccharomyces oviformis, Kloeckera apiculata, Candida pulcherrima, Candida mycoderma, Pichia membranaefaciens, Rhodotorula glutinis* proviennent de l'Institut Pasteur de Paris. Elles ont été isolées de moûts et de vins. Leurs caractères morphologiques et physiologiques ont été vérifiés, au moment de leur utilisation, à l'aide des techniques décrites par LODDER (1970).

Les sérums antilevures

Ils ont été préparés suivant la méthode de BESSIÈRE *et al.* (1966) en immunisant des lapins adultes, par voie intraveineuse, avec les différentes souches étudiées. Ces animaux reçoivent seize injections d'une suspension de levures vivantes, au rythme d'une injection par semaine. La dose initiale est de 10^6 levures, les doses suivantes sont augmentées chaque fois de 3×10^6 levures pour atteindre 45×10^6 levures à la dernière injection.

Réaction d'agglutination

Elle est réalisée en tubes sur des levures entières employées à la concentration de 10^7/ml et provenant d'une culture de 48 heures sur le milieu solide de Sabouraud. Ces suspensions de levures sont mélangées à volume égal avec les dilutions de sérums décomplémentés à étudier. Les lectures sont effectuées après 12 heures à l'étuve à la température de 37°C, par rapport à un sérum témoin et à la suspension de levures diluée de moitié dans le sérum physiologique.

Réaction d'immunofluorescence

Nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte de WELLER et COONS (1954), appliquée notamment par COUDERT *et al.* (1968) dans ses études antigéniques sur les *Candida*. L'antiglobuline lapin marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine BD Mérieux a été diluée au 1/10 dans le tampon phosphate pH 7,2 au lieu de 1/20. La contre-coloration est réalisée avec du bleu d'Evans dilué au 1/1 000 au lieu d'une concentration de 1/10 000, et pendant 15 minutes au lieu de 10 minutes. L'examen microscopique est effectué en lumière UV et fond clair, à l'aide d'un microscope Leitz Orthoplan, muni d'oculaires × 10 et d'un objectif × 25. Les filtres employés sont à l'émission un filtre BG 12 de 4 mm et à la sortie un filtre d'arrêt K 530.

Les résultats sont lus sur les préparations montées à l'état sec, puis sur les préparations montées dans une goutte de glycérine tamponnée. Cette double lecture permet d'augmenter la spécificité. En effet, la fluorescence jaune-verte des levures apparaît plus nette avec la glycérine et la coloration rouge observée avec une réaction négative est plus intense dans le cas du montage à sec.

Méthode d'épuisement des sérums

Les sérums sont additionnés de levures récoltées après 48 heures de culture sur milieu solide de Sabouraud et lavées à trois reprises dans du sérum physiologique. La concentration en levures est d'environ $60 \cdot 10^6$ cellules par ml de sérum. Ils sont ensuite placés 12 heures à la température de 37°C, puis 24 heures à + 4°C, enfin centrifugés à 4 000 *g* pendant 15 minutes. Après élimination du culot, le surnageant est à nouveau additionné de levures et placé au bain-marie à 37°C pendant 4 heures puis à + 4°C pendant 12 heures. Le sérum est alors récupéré par centrifugation à 4 000 *g* pendant 15 minutes. On vérifie que le degré d'épuisement de ces sérums est total par une réaction d'agglutination. Dans le cas contraire, on recommence l'opération indiquée.

RÉSULTATS

Nous avons présenté nos résultats sous forme de deux tableaux. Le tableau 1 montre tout d'abord que les taux d'agglutination vis-à-vis des souches homologues sont compris entre 1/10 et 1/640. La majorité des sérums agglutine l'antigène homologue à la dilution de 1/320. Si l'on considère les titres obtenus à l'aide de la technique d'immunofluorescence, on remarque qu'ils sont inférieurs d'une dilution par rapport aux précédents, dans le cas de *K. apiculata, C. mycoderma* et de *C. pulcherrima,* et nettement supérieurs pour P. *membranaefaciens* et *R. glutinis.*

Ce tableau met ensuite en évidence des réactions croisées entre les levures suivantes : *S. cerevisiae* et *S. oviformis ; C. mycoderma* et *C. pulcherrima ; S. cerevisiae, S. oviformis* et *C. pulcherrima, C. mycoderma ; C. mycoderma, C. pulcherrima* et *P. membranaefaciens ; C. mycoderma, C. pulcherrima* et *K. apiculata.*

R. glutinis ne présente donc pas de réactions croisées avec les autres levures étudiées.

Le tableau 2 montre que l'épuisement du sérum anti *S. cerevisiae* par *S. oviformis* n'élimine pas l'agglutination de S. *cerevisiae* alors que l'inverse ne produit aucune agglutination.

L'épuisement du sérum anti *P. membranaefaciens* par *C. mycoderma* supprime l'agglutination de *P. membranaefaciens,* que ne supprime pas l'épuisement par *C. pulcherrima.* L'épuisement du sérum anti *C. mycoderma* par *S. cerevisiae, S. oviformis, C. pulcherrima* n'élimine pas l'agglutination de *C. mycoderma.* Le sérum anti *C. pulcherrima* épuisé par *S. cerevisiae, S. oviformis, C. mycoderma* agglutine encore *C. pulcherrima.* Enfin, l'épuisement du sérum anti *K. apiculata* par *C. mycoderma, C. pulcherrima, P. membranaefaciens* n'élimine pas l'agglutination de *K. apiculata.*

DISCUSSION

Les méthodes que nous avons employées et les résultats que nous avons obtenus en recherchant la présence éventuelle d'antigènes communs d'une part avec des sérums immuns, d'autre part avec ces mêmes sérums épuisés par différents antigènes, nous permettent de formuler plusieurs remarques.

Tout d'abord l'obtention des immunsérums par la technique de Bessière (1966) est très longue. En effet, quatre mois ont été nécessaires pour obtenir des sérums de titre moyen 1/320. L'utilisation d'un adjuvant serait donc à envisager. De plus, les essais d'immunisation par injection simultanée de deux souches de levures ont donné des sérums de titre inférieur à ceux qui avaient été obtenus avec des injections séparées, comme le montre à la quinzième injection le tableau 3. Le phénomène de compétition antigénique signalé par Fasquelle *et al.* (1958) dans le cas des bactéries se retrouve donc avec les levures.

Les techniques d'immunofluorescence et d'agglutination donnent en général des résultats très voisins, la différence d'une dilution ne pouvant être considérée

TABLEAU I

Recherche à l'aide des méthodes d'agglutination et d'immunofluorescence des réactions croisées éventuelles entre sept souches de levures

Anticorps		Antigène													
		S. cerevisiae		*S. oviformis*		*K. apiculata*		*C. mycoderma*		*C. pulcherrima*		*P. membranaefaciens*		*R. glutinis*	
		Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF
Sérum anti *S. cerevisiae*	1/10	+	++++	+	++++	—	—	—	+	+	+	—	++	—	—
	1/20	+	+++	+	+++	—	—	—	—	+	+	—	++	—	—
	1/40	+	+++	+	++	—	—	—	—	—	±	—	+	—	—
	1/80	+	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/160	+	++	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/320	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/640	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum anti *S. oviformis*	1/10	+	+++	+	++++	—	±	—	+	+	+	—	+	—	—
	1/20	+	++	+	++++	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—
	1/40	+	++	+	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/80	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/160	±	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/320	—	—	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum anti *K. apiculata*	1/10	+	±	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+++	—	+
	1/20	±	—	±	—	+	+	+	+	+	+	+	+++	—	±
	1/40	—	—	—	—	+	+	—	—	±	±	±	++	—	±
	1/80	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	1/160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—
	1/320	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum anti *C. mycoderma*	1/10	+	++	+	±	—	+	+	++	+	++	+	++++	—	—
	1/20	+	+	+	—	—	±	+	++	+	+	+	+++	—	—
	1/40	+	±	±	—	—	—	+	+	+	±	+	++	—	—
	1/80	+	—	—	—	—	—	+	+	±	—	+	++	—	—
	1/160	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—
	1/320	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum anti *C. pulcherrima*	1/20	+	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/40	+	+	+	+	—	—	+	+	+	++	—	—	—	—
	1/80	+	±	+	±	—	—	—	+	+	±	—	—	—	—
	1/160	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
	1/320	±	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum anti *P. membranaefaciens*	1/10	—	±	—	±	+	—	+	+	+	±	+	+++	—	—
	1/20	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	+	++	—	—
	1/40	—	—	—	—	—	—	+	—	±	—	+	++	—	—
	1/80	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	++	—	—
	1/160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	1/320	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum anti *R. glutinis*	1/10	—	++	—	±	—	±	—	±	—	±	—	—	+	++
	1/20	—	+	—	—	—	±	—	—	—	±	—	—	±	++
	1/40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	1/80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	1/160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
	1/320	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérum témoin	1/10	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—
	1/20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/40	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0
	1/80	—	0	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0
	1/160	—	0	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0
	1/320	—	0	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0
	1/640	—	0	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0
Absence de sérum		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

++++ Fluorescence très fortement positive
++ Fluorescence positive
± Fluorescence douteuse
— Pas de fluorescence.

+++ Fluorescence fortement positive
+ Fluorescence faiblement positive
0 Réaction non effectuée.

TABLEAU 2

Étude à l'aide des méthodes d'agglutination et d'immunofluorescence des réactions croisées relevées dans le tableau 1, après épuisement des sérums correspondants

Anticorps		Antigène											
		S. cerevisiae		*S. oviformis*		*K. apiculata*		*C. mycoderma*		*C. pulcherrima*		*P. membranaefaciens*	
		Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF	Aggl.	IF
Sérum anti *S. cerevisiae* épuisé par *S. oviformis*	1/10	+	+	—	—								
	1/20	+	+	—	—								
	1/40	+	+	—	—								
	1/80	+	±	—	—								
Sérum anti *S. oviformis* épuisé par *S. cerevisiae*	1/10	—	—	—	—								
	1/20	—	—	—	—								
	1/40	—	—	—	—								
	1/80	—	—	—	—								
Sérum anti *K. apiculata* épuisé par *C. mycoderma*	1/10					+	+	—	—				
	1/20					±	±	—	—				
	1/40					—	—	—	—				
	1/80					—	—	—	—				
Sérum anti *K. apiculata* épuisé par *C. pulcherrima*	1/10					+	+			—	—		
	1/20					+	+			—	—		
	1/40					±	±			—	—		
	1/80					—	—			—	—		
Sérum anti *K. apiculata* épuisé par *P. membranaefaciens*	1/10					+	±					±	—
	1/20					+	±					—	—
	1/40					±	—					—	—
	1/80					—	—					—	—
Sérum anti *C. mycoderma* épuisé par *C. pulcherrima*	1/10							+	+	—	—		
	1/20							+	+	—	—		
	1/40							+	+	—	—		
	1/80							+	±	—	—		
Sérum anti *C. mycoderma* épuisé par *S. cerevisiae*	1/10	—	—					+	+				
	1/40	—	—					+	+				
	1/80	—	—					+	±				
Sérum anti *C. mycoderma* épuisé par *S. oviformis*	1/10			—	—			+	+				
	1/20			—	—			+	+				
	1/40			—	—			+	+				
	1/80			—	—			+	±				
Sérum anti *C. pulcherrima* épuisé par *C. mycoderma*	1/10							±	—	+	+		
	1/20							—	—	+	+		
	1/40							—	—	+	+		
	1/80							—	—	+	+		
Sérum anti *C. pulcherrima* épuisé par *S. cerevisiae*	1/10	±	—							+	+		
	1/20	—	—							+	+		
	1/40	—	—							+	+		
	1/80	—	—							+	+		
Sérum anti *C. pulcherrima* épuisé par *S. oviformis*	1/10			—	—					+	+		
	1/20			—	—					+	+		
	1/40			—	—					+	+		
	1/80			—	—					+	+		
Sérum anti *P. membranaefaciens* épuisé par *C. mycoderma*	1/10							—	—			—	±
	1/20							—	—			—	±
	1/40							—	—			—	±
	1/80							—	—			—	±
Sérum anti *P. membranaefaciens* épuisé par *C. pulcherrima*	1/10									—	—	+	+
	1/20									—	—	+	+
	1/40									—	—	±	±
	1/80									—	—	—	±

comme significative. Les divergences observées dans le cas de *P. membranaefaciens* sont dues à la fluorescence propre très importante de cette levure, ce qui rend douteux les résultats de lecture d'immunofluorescence. En conséquence, la contre-coloration n'est guère efficace. Les divergences relevées dans le cas de *R. glutinis* s'expliquent vraisemblablement par la composition chimique particulière de la paroi cellulaire de cette levure. En effet, LODDER (1970) indique que certaines de ces souches produisaient de l'amidon, mis en évidence par le test à l'iode. USDEN et BURREL (1958) ont isolé un sucre qui par hydrolyse libère du glucose. On ne retrouve ni mannane, ni glucane caractéristique des parois cellulaires de la levure de boulangerie, mais on trouve de la chitine.

TABLEAU 3

Étude des compétitions antigéniques dans le cas de quelques levures de vinification

Anticorps	Antigène		Anticorps	Antigène	
	C. mycoderma	*C. pulcherrima*		*K. apiculata*	*P. membranaefaciens*
Sérum anti *C. mycoderma*	1/320	0	Sérum anti *K. apiculata*	1/80	0
Sérum anti *C. pulcherrima*	0	1/320	Sérum anti *P. membranaefaciens*	0	1/160
Sérum anti *C. mycoderma* + *C. pulcherrima*	1/40	1/80	Sérum anti *K. apiculata* + *P. membranaefaciens*	1/20	1/20

La technique d'immunofluorescence fournit donc une méthode de dosage quantitatif des anticorps, de sensibilité légèrement inférieure à celle de l'agglutination, mais qui présente l'avantage de révéler les anticorps dits « incomplets » et de localiser les antigènes cellulaires. Appliquée à des levures vivantes, mises en suspension dans le sérum à étudier, cette méthode permet de constater que la fluorescence est maximum au niveau de la paroi.

Nous envisageons donc, dans un second temps, de séparer les divers constituants cellulaires afin de localiser avec précision les antigènes.

Au cours de ce travail, nous n'avons utilisé qu'une seule souche de chaque espèce. Du point de vue taxonomique cette étude ne peut donc être que préliminaire. Cependant nous avons pu mettre en évidence des parentés antigéniques étroites entre les levures d'un même genre de la classification de LODDER (tabl. 1). Les résultats obtenus en ce qui concerne *S. cerevisiae* et *S. oviformis* confirment bien ceux de TSUCHIYA, FUKAZAWA et YAMASE (1961) qui ont montré que la structure antigénique de ces deux levures ne différait que par deux antigènes thermolabiles *a* et *e*.

La similitude antigénique que nous avons observée entre *C. mycoderma* et *P. membranaefaciens* est en accord avec les modifications de classification effectuées

par LODDER (1970). *C. mycoderma* est en effet considérée maintenant comme la forme asporulée de *P. membranaefaciens*.

Par contre, les parentés antigéniques entre *K. apiculata* et *S. cerevisiae*, *K. apiculata* et *P. membranaefaciens* sont en discordance avec cette même classication. Il semble donc que la distinction entre levures ascosporées et anascosporées, base de classification, ne puisse être retenue quand on utilise les tests sérologiques. Cette conclusion confirme d'ailleurs les résultats obtenus par TSUCHIYA *et al.* (1957) qui ont pu mettre en évidence une similitude entre *S. cerevisiae* et *C. robusta* et ceux de GEK et NOVAK (1967). Ces derniers auteurs ont étudié 102 espèces de levures, en utilisant un sérum anti *C. albicans* et la technique d'immunofluorescence ; ils ont ainsi révélé l'existence de groupes sérologiques englobant levures ascosporées et anascosporées.

L'ensemble de ces résultats nous conduit à formuler l'hypothèse que les parentés antigéniques existant entre ces levures pourraient être à l'origine de la constance de leur ordre d'apparition au cours des vinifications. En effet, si l'on explique la succession des genres : *Kloeckera, Saccharomyces, Candida* et *Pichia* par les modifitions du milieu au cours de la vinification, et notamment par la formation d'alcool, on n'explique pas ainsi la constance d'apparition des espèces au sein de ces genres.

CONCLUSION

L'étude des propriétés antigéniques de sept levures de vinification nous a permis de mettre en évidence des parentés étroites entre celles-ci. Ces parentés qui devront être précisées pourraient peut-être expliquer la constance de l'ordre d'apparition de ces levures au cours des vinifications.

La mise en œuvre simultanée de deux techniques sérologiques dont les résultats se complètent a révélé la non agglutination de *R. glutinis* par l'immunsérum homologue. Une étude de la constitution chimique de la paroi de cette levure est donc à envisager pour déterminer si l'on se trouve en présence d'un phénomène dû à des polysaccharides, analogue à celui observé chez les bactéries capsulées.

Reçu pour publication en novembre 1971.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. BRÉCHOT et M. GIRARD du Laboratoire des Fermentations qui nous ont procuré les souches nécessaires pour la réalisation de ce travail.

SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF THE ANTIGENES OF SEVEN WINEMAKING YEASTS BY MEANS OF AGGLUTINATION AND IMMUNOFLUORESCENCE

Using monospecific sera and two serological technics, agglutination and immunofluorescence, the authors have shown antigenic relationships between seven winemaking yeasts. *Rhodotorula glutinis* is not agglutinated by its similar antiserum, a peculiarity which could be related to the chemical constitution of the cell-wall.

RESUMEN

ESTUDIO COMPARADO DE SIETE LEVADURAS DE VINIFICACIÓN MEDIANTE AGLUTINACIÓN E IMMUNOFLUORESCENCIA

Los autores han emprendido estudios encaminados a demostar la existencia de parentescos antigénicos entre siete levaduras de vinificación, por medio de sueros monoespecíficos y de dos técnicas serológicas : la aglutinación y la immunofluorescencia.

La *Rhodotorula glutinis* no queda aglutinada por el suero homólogo, particularidad vinculada posiblemente con la composición química de la pared de esta levadura.

RIASSUNTO

STUDIO COMPARATO DEGLI ANTIGENI DI SETTE LIEVITI DI VINIFICAZIONE MEDIANTE AGGLUTINAZIONE E IMMUNOFLUORESCENZA

Con dei sieri monospecifica e due techniche sierologiche, l'agglutinazione e l'immunofluorescenza, gli autori hanno dimostrato l'esistenza di affinitá tra sette lieviti di vinificazione. Il *Rhodotorula glutinis* non è agglutinato dal siero omologo ; questa particolarità è forse dovuta alla composizione chimica della parete di questo lievito.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENDA I., 1964. Die Hefeflora des Gräkischen Weinbaugebietes. *Weinb. Keller*, **11**, 67-80.

BERCHEV K., ISMIROV I., 1967. Immunofluorescent and immunophoretic data on antigenic properties of *C. albicans*. *Experientia*, **23** (2), 103-104.

BESSIÈRE C., BASTIDE J.-M., BASTIDE M., NAKAM J., 1966. Étude antigénique de certaines espèces de levures par immunofluorescence. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **25** (4), 256-261.

BIGUET J., HAVEZ R., TRAN VAN KY P., DEGAEY R., 1961. Étude électrophorétique, chromatographique et immunologique des antigènes de *C. albicans*. *Ann. Inst. Pasteur*, **100**, 13-24.

BRÉCHOT P., CHAUVET J., GIRARD H., 1962. Identification des levures d'un moût de Beaujolais au cours de sa fermentation. *Ann. Technol. agric.*, **11** (3), 235-244.

CASTELLI T., IGNIGO LEAL, 1958. Los agentes de la fermentación vinica en la region manchega y zona limitrofes. *Inst. Ferment. industr. Madrid*, **13**, 1.

COUDERT J., KIEN TRUONG THAI, AMBROISE-THOMAS P., DOUCHET C., 1968. Études antigéniques comparées du genre *Candida* par immunoflorescence, agglutination et électrophorèse. *Ann. Inst. Pasteur*, **114**, 287-296.

DOMERCQ S., 1957. Étude et classification des levures de vin de la Gironde. *Ann. Technol. agric.*, 5-58 ; 139-180.

FASQUELLE R., BARBIER P., DAGUET G., GOULET P., 1958. *Éléments d'immunologie générale*, 185. Masson, Paris.

GEK P., NOVAK E. K., 1967. Immunofluorescent studies on yeasts. *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.*, **14**, 13-22.

LODDER J., 1970. *The yeasts : a taxonomic study*. North Holland Publishing Co, Amsterdam.

RIMBAUD P., BASTIDE J.-M., NAKAM J., 1966. Étude de quelques espèces du genre *Candida* par immunofluorescence. *Bull. Soc. Gr. Dermatol. Syphiligr.*, **73** (3), 275-278.

TSUCHIYA T., FUKAZAWA Y., HAYASHI S., HAYASHI J., DOI M., 1957. Serological relationships among ascosporogenous and anascosporogenous yeasts. I. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida robusta*. *Jap. J. Microbiol.*, **1** 125-131.

TSUCHIYA T., FUKAZAWA Y., HAYASHI T., NISKIKAWA Y., DOI M., 1957. Serological classification of the genus *Hansenula*. *Jap. J. Microbiol.*, **1**, 339-346.

TSUCHIYA T., FUKAZAWA Y., SANO Y., SHIMURA Y., MURATA T., 1960. Serological classification of the genus *Debaryomyces* and *Schwanniomyces*. *Jap. J. Microbiol.*, **4**, 61-71.

TSUCHIYA T., FUKAZAWA Y., YAMASE Y., 1961. Serological classification of the genus *Saccharomyces*. II. *Jap. J. Microbiol.*, **5**, 417-429.

USDEN U. R., BURREL R. C., 1958. *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 172. Cité par EDDY A. A. 1958, in *The chemistry and biology of yeasts*. Cook, Academic Press, New-York.

WELLER T. H., COONS A. H., 1954. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated *in vitro*. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **86**, 789-794.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 335-346.

TENEUR EN TANINS DES BOISSONS SÉPARATION ET DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA FRACTION POLYPHÉNOLIQUE ASTRINGENTE

S. MITJAVILA, M. SCHIAVON et R. DERACHE

Groupe de Recherches sur la Toxicologie des Aliments et des Boissons
(I. N. S. E. R. M. - U. 87)
Institut de Physiologie, 84, Grande-Rue-Saint-Michel,
31 - Toulouse

RÉSUMÉ

Nous avons déterminé la teneur en tanins de diverses boissons (vins, eaux-de-vie, bières et jus de fruits) par une méthode originale basée sur un caractère spécifique des tanins : l'astringence. Après dilution préalable des boissons, les tanins présents dans l'échantillon forment un complexe soluble avec la polyvinylpyrrolidone ; ce complexe est précipité intégralement par addition d'acide trichloracétique, puis on sépare par centrifugation le précipité contenant les tanins du surnageant renfermant les composés phénoliques non astringents. Après dissolution du précipité, un dosage colorimétrique est effectué à l'aide du réactif de Folin et Ciocalteu. A partir du surnageant, on peut réaliser un dosage global des composés phénoliques non astringents. La méthode décrite permet de doser entre 10 et 50 µg de tanins hydrolysables ou condensés, avec une précision de l'ordre de 2 p. 100.

Mots clés : *dosage, tanins, boissons, polyphénols.*

I. — INTRODUCTION

La détermination des tanins dans les aliments est nécessaire pour des raisons de technologie et de nutrition. Les méthodes de dosage des tanins sont très variées et reposent souvent sur une définition particulière des substances tannantes ; ainsi, les termes « tanoïde » ou « œnotanin » usités en œnologie désignaient, à l'origine, l'ensemble des composés polyphénoliques présents dans les vins. En conséquence,

l'indice de permanganate qui était considéré comme une mesure des « œnotanins » (NEUBAUER, 1872) constituait en fait un dosage global des composés phénoliques (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1958). Il en est de même des mesures faites couramment à l'aide des réactifs de Folin et Denis (ROSENBLATT et PELUSO, 1941 ; VALAER, 1941 ; PRO, 1952) ou de Folin et Ciocalteu (SNELL et SNELL, 1953 ; SINGLETON et ROSSI, 1965) et si l'on exprime les résultats obtenus en acide tannique toutes les méthodes précédentes donnent, pour un même vin, des valeurs comparables (ROSENBLATT et PELUSO, 1941 ; VALAER, 1941). Du point de vue alimentaire, il paraît logique de qualifier de « tanins » uniquement les substances astringentes d'origine phénolique ; à ce propos, RIBÉREAU-GAYON (1968) souligne que, sous la désignation de tannoïdes, on a l'habitude d'englober toute une série de substances, telles les acides chlorogéniques et les catéchines, qui donnent la réaction avec le permanganate ou qui se colorent avec le réactif de Folin et avec les sels ferriques, mais qui ne possèdent pas les caractéristiques organoleptiques des tanins, d'où une confusion regrettable.

D'autres méthodes de dosage sont basées sur le fait que les flavanes-3,4-diols ou leucoanthocyanes sont les précurseurs les plus importants des tanins condensés et on utilise pour leur dosage la propriété de ces composés de se transformer en anthocyanes rouges par chauffage en milieu acide (PIGMAN *et al.*, 1953 ; MASQUELIER *et al.* 1959). Les tanins sont dosés indirectement par différence entre les leucoanthocyanes totaux et les leucoanthocyanes présents après élimination des tanins par relargage au chlorure de sodium (MASQUELIER *et al.*, 1959). La méthode de PUISAIS *et al.*, (1968) est basée sur le même principe, mais le dosage final est réalisé dans l'UV. Ces derniers dosages ne font pas intervenir l'activité astringente des tanins mais un caractère physico-chimique : le poids moléculaire. La saturation par le NaCl précipite en effet les leucoanthocyanes d'un degré de polymérisation compris entre l'hexamère et le décamère (MASQUELIER et MICHAUD, 1965).

La propriété caractéristique des tanins, c'est-à-dire leur faculté de transformer la peau en cuir, ou plus précisément leur aptitude à donner des complexes insolubles avec les protéines, est à la base d'un certain nombre de dosages ; ainsi, les techniques gravimétriques ou turbidimétriques, courantes dans l'industrie du cuir, utilisent la poudre de peau blanche non chromée, la poudre de cheveux (NICK, 1953), la précipitation des protéines du lait (GSTIRNER et KORF, 1966) ou l'agglutination des globules rouges (WASICKY, 1917 ; GSTIRNER *et al.*, 1956). Ces méthodes sont peu pratiques et leur application dans l'industrie alimentaire est rare, sauf peut-être la méthode classique à la poudre de peau.

Le dosage de l'acide tannique proposé par MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN (1959), MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN et KUDREWICZ-HUBICKA (1966) mérite une attention particulière car il présente l'avantage de fixer spécifiquement ce tanin par la caséine ; le complexe formé est redissous à l'aide d'une solution d'urée, ce qui permet de doser directement par colorimétrie la fraction phénolique tannante. Dans un travail antérieur (MITJAVILA et DERACHE, 1968), nous avions décrit un dosage beaucoup plus simple de l'acide tannique, en présence d'autres composés phénoliques, qui mettait en œuvre la formation d'un complexe avec la polyvinylpyrrolidone. Dans le présent travail, nous avons essayé de généraliser cette méthode en améliorant sa sensibilité et en la rendant apte à déterminer les substances phénoliques astringentes, qu'il s'agisse de tanins condensés ou de tanins hydrolysables.

II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Principe du dosage

Le dosage des tanins dans un milieu phénolique complexe repose sur le principe suivant : les tanins, aux faibles concentrations utilisées, donnent avec la polyvinylpyrrolidone (PVP) un complexe soluble qui précipite intégralement par addition d'acide trichloracétique (TCA) ; après centrifugation les formes phénoliques non astringentes restent dans le surnageant ; on sépare le surnageant du complexe précipité et les deux fractions, tannante et non tannante, sont dosées séparément par la méthode colorimétrique de Folin et Ciocalteu.

Réactifs

I : Polyvinylpyrrolidone Merck (PM = 25 000-30 000) : 0,2 g pour 100 ml
II : Acide trichloracétique Merck : 20 g pour 100 ml
III : Réactif de Folin-Ciocalteu Merck dilué à 50 pour 100 avant l'emploi
IV : NaOH 1,5 N
V : CO_3Na_2 anhydre : 12 g pour 100 ml

Composés phénoliques

AG : Acide gallique Merck
C : D-Catéchine Fluka
L : Leucocyanidol (dimère)
AT : Acide tannique purifié par extraction à l'acétate d'éthyle
Œ : Œnotanin purifié par extraction à l'alcool

Courbes-étalons

Nous avons réalisé les courbes-étalons des composés phénoliques, cités ci-dessus, susceptibles d'être utilisés comme substances de référence. Pour vérifier la viabilité de cette méthode, nous avons fait deux sortes de courbes-étalons : l'une sans séparation des fractions tannante et non tannante, l'autre avec séparation.

Courbe-étalon sans séparation des fractions

On introduit dans des tubes à centrifuger de 7 ml des volumes variant de 0,1 à 0,5 ml d'une solution de composé phénolique à la concentration de 100 µg par ml. On complète le volume à 3 ml avec de l'eau, puis on ajoute successivement 0,5 ml de réactif I, 0,5 ml de réactif III et 1 ml de réactif V. Après chaque addition, il est important de bien mélanger, car en milieu alcalin (addition des réactifs IV ou V) certains composés phénoliques, tel l'acide gallique, s'oxydent très facilement et faussent la coloration. Nous avons obtenu d'excellents résultats en agitant le contenu du tube à l'aide d'un faible courant d'azote. La coloration se développe en chauffant les tubes à 40°C pendant 20 minutes, et la densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 725 nm contre un blanc contenant de l'eau à la place de la solution-étalon.

Courbe-étalon avec séparation des deux fractions

On introduit dans des tubes à centrifuger de 7 ml des volumes variant de 0,1 à 0,5 ml d'une solution de composé phénolique à la concentration de 100 µg par ml ou d'un mélange de deux composés phénoliques, l'un tannant, l'autre non, chacun à la concentration de 100 µg par ml. On complète le volume à 0,5 ml avec de l'eau, puis on ajoute 0,5 ml de réactif I et 1 ml de réactif II. En agitant il se forme un précipité qui contient la totalité des composés phénoliques à activité tannante (la précipitation se trouve facilitée en opérant dans un bain d'eau glacée).

On centrifuge les tubes 5 minutes à 2 500 *g*, puis on décante soigneusement le surnageant séparant ainsi les fractions tannante et non tannante. On lave le précipité avec 0,5 ml de réactif II, on centrifuge à nouveau et on mélange les 2 surnageants. Le précipité est dissous dans 3,5 ml d'eau, puis on ajoute 0,5 ml de réactif III, et 1 ml de réactif V. Aux 2,5 ml de surnageant on ajoute 0,5 ml de réactif III, 1 ml de réactif IV et 1 ml de réactif V, en prenant la précaution d'agiter, comme indiqué au paragraphe précédent, pour éviter l'oxydation. Les deux fractions sont chauffées à 40°C pendant 20 minutes, on mesure la densité optique au spectrophotomètre à 725 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais contenant 0,5 ml d'eau à la place de la solution phénolique.

Étalonnage interne d'un vin

Nous avons cru important de vérifier la reproductibilité de la méthode ; à cet effet nous avons dosé dans les mêmes conditions un vin dilué au 1/25 puis le même vin additionné de 100 µg d'œnotanin par ml. Ceci pouvait nous apporter des renseignements sur la possibilité d'adsorption des anthocyanes sur les tanins au cours du dosage, ce qui aurait pu fausser le résultat final. A cet effet, nous avons utilisé un vin rouge de la région toulousaine, élaboré dans une petite exploitation familiale selon des méthodes traditionnelles et n'ayant fait l'objet d'aucun traitement.

Dosage dans les boissons

On procède à une dilution préalable avec de l'eau et les liquides troubles ou présentant des substances insolubles sont centrifugés. Les vins rouges, les vins rosés, la bière brune et le jus de pomme sont dilués au 1/25 ; les vins blancs, les eaux-de-vie, le jus de raisin et la bière blonde sont dilués au 1/15. Dans ces conditions, le degré alcoolique de la solution à doser ne dépasse jamais 10° et nous avons vérifié au préalable que les solutions alcooliques inférieures à 20° ne modifient pas le dosage ; il est donc inutile de désalcooliser les boissons.

Sur les dilutions, on fait une prise d'essai de 0,5 ml puis on procède au dosage soit des composés phénoliques totaux soit des fractions tannante et non tannante, selon les méthodes décrites ci-dessus.

III. — RÉSULTATS

La figure 1 présente les courbes-étalons obtenues sans séparation des deux fractions. On peut noter que, pour une même concentration, les divers composés phénoliques ne donnent pas la même densité optique, mais on peut grouper d'une

TABLEAU I

Moyennes et erreurs types des DO obtenues pour la gamme-étalon des divers composés phénoliques, sans séparation

Microgrammes de composé phénolique	10	20	30	40	50
Leucocyanidol(1) ..	0,230 ± 0,002	0,469 ± 0,005	0,700 ± 0,007	0,924 ± 0,006	1,154 ± 0,005
Œnotanin(1)	0,212 ± 0,003	0,431 ± 0,007	0,659 ± 0,008	0,876 ± 0,005	1,088 ± 0,010
Acide gallique(2) ..	0,268 ± 0,002	0,533 ± 0,004	0,815 ± 0,009	1,090 ± 0,008	1,336 ± 0,014
Acide tannique(2) ..	0,276 ± 0,004	0,525 ± 0,010	0,807 ± 0,005	1,083 ± 0,016	1,348 ± 0,032
D-catéchine(2)	0,292 ± 0,003	0,570 ± 0,011	0,836 ± 0,010	1,092 ± 0,018	1,411 ± 0,016

(1) Moyennes et erreurs types de 5 expériences.
(2) Moyennes et erreurs types de 3 expériences.

part la D-catéchine, l'acide gallique et l'acide tannique et d'autre part le leucocyanidol et l'œnotanin. Le tableau 1 montre que, malgré le nombre réduit d'expériences, la reproductibilité de la méthode est bonne, l'erreur-type des mesures effectuées au spectrophotomètre étant de l'ordre de 2 p. 100.

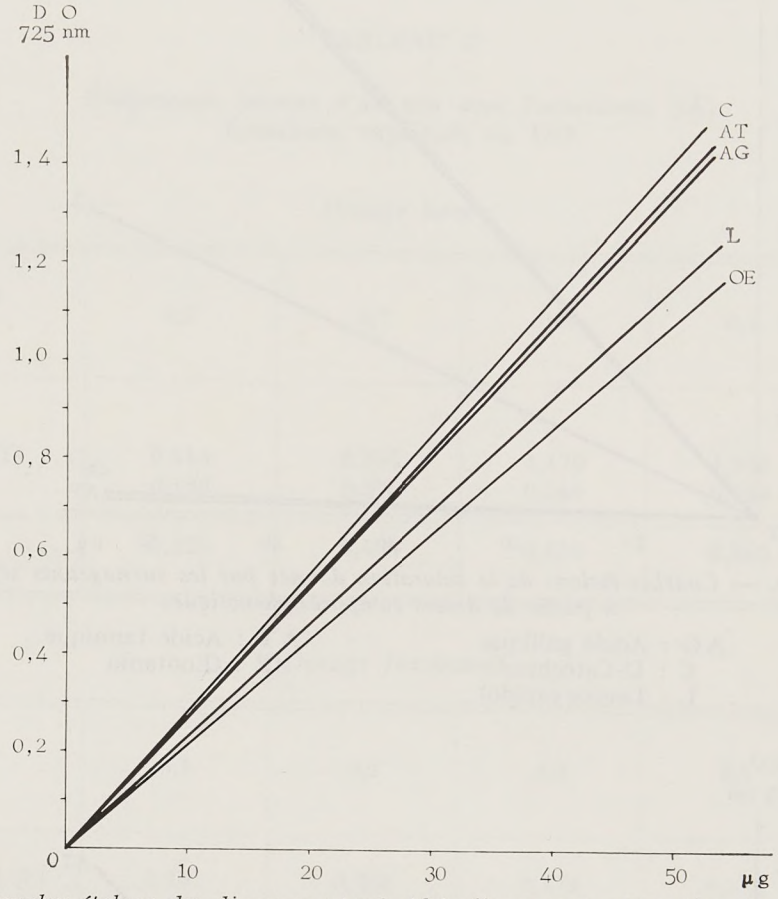


FIG. 1. — *Courbes-étalons des divers composés phénoliques sans séparation des deux fractions*

AG : Acide gallique
C : D-Catéchine
L : Leucocyanidol
AT : Acide tannique
Œ : Œnotanin

Sur les figures 2 et 3, nous pouvons voir les courbes-étalons obtenues après séparation des deux fractions ; cette séparation permet d'apprécier d'une part la pureté des échantillons et d'autre part l'activité tannante des divers composés phénoliques, puisqu'on les retrouve dans le précipité, tandis que dans le surnageant on retrouve les substances non tannantes.

Ainsi nos résultats confirment que l'acide gallique et la D-catéchine ne sont pas des tanins, et que l'œnotanin et l'acide tannique utilisés sont très purs puisqu'ils donnent peu de coloration dans le surnageant. Par contre, le dimère du leucocyanidol se sépare nettement en deux fractions.

Étalonnage interne

Le tableau 2 donne les résultats concernant l'étalonnage interne d'un vin avec de l'œnotanin à 100 µg par ml. Pour le dosage total, les quantités d'œnotanin (Œ)

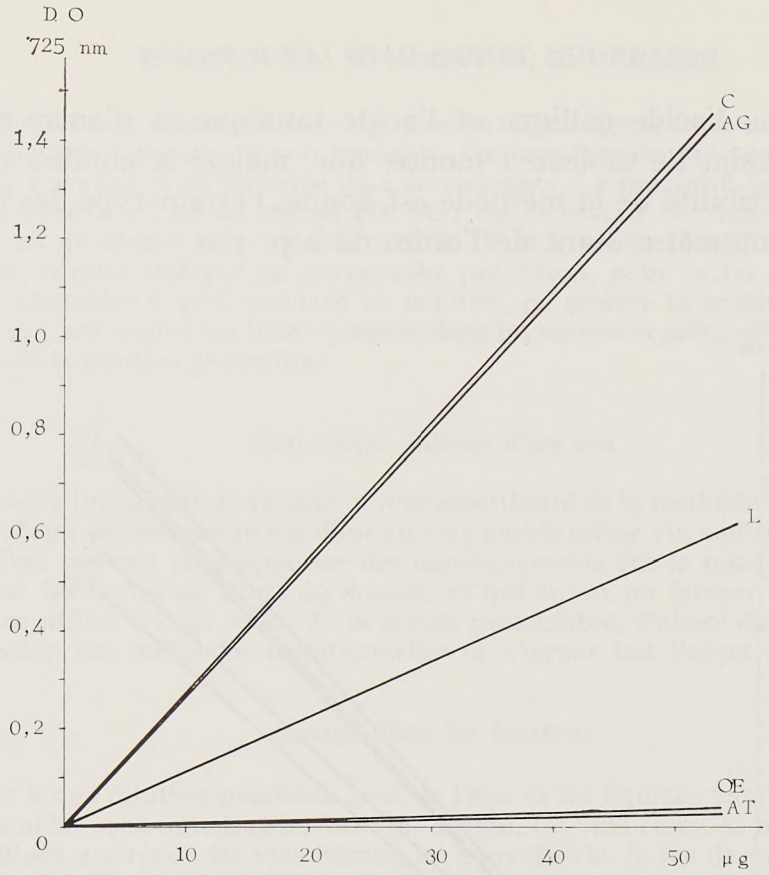


FIG. 2. — *Courbes-étalons de la coloration donnée par les surnageants séparés à partir de divers composés phénoliques*

A G : Acide gallique — A T : Acide tannique
C : D-Catéchine — Œ : Œnotanin
L : Leucocyanidol

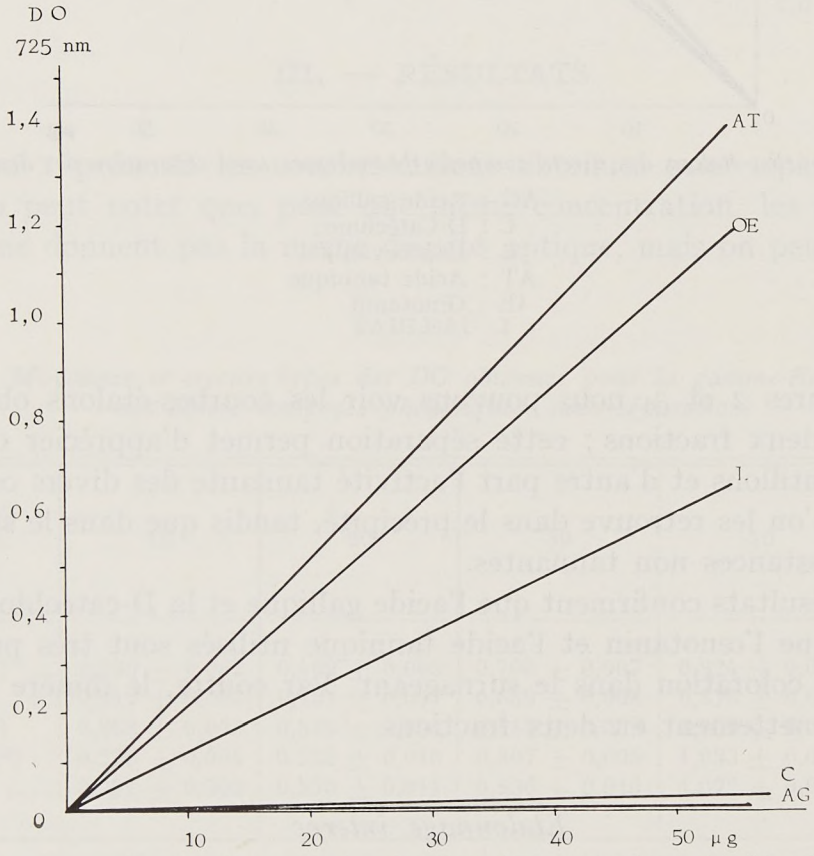


FIG. 3. — *Courbes-étalons de la coloration donnée par les précipités séparés à partir de divers composés phénoliques*

A G : Acide gallique — A T : Acide tannique
C : D-Catéchine — Œ : Œnotanin
L : Leucocyanidol

exprimées en DO sont obtenues par soustraction des valeurs du vin (T′) de celles du vin additionné d'œnotanin (T) et comme on peut le constater elles coïncident assez bien avec la courbe-étalon de l'œnotanin (fig. 1 et tabl. 1), sauf pour les prises d'essai de 0,5 ml ; mais, dans ce cas, la réponse du spectrophotomètre doit être mise

TABLEAU 2

Étalonnage interne d'un vin avec l'œnotanin (Œ)
Résultats exprimés en DO

Dosage total

Prise d'essai (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Vin 1/25 + 100 µg Œ/ml (T)	0,415	0,805	1,170	1,560	≃ 1,900
Vin 1/25 (T′)	0,190	0,370	0,540	0,720	0,890
ΔŒ total (T - T′)	0,225	0,435	0,630	0,840	≃ 1,000

Dosage fractionné

Prise d'essai (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Vin 1/25 + 100 µg Œ/ml (S) ..	0,137	0,260	0,375	0,492	0,607
Vin 1/25 + 100 µg Œ/ml (P) .	0,292	0,550	0,810	1,070	1,330
Vin 1/25 (S′)	0,118	0,235	0,348	0,460	0,570
Vin 1/25 (P′)	0,055	0,117	0,170	0,225	0,285
ΔŒ surnageant (S - S′).	0,019	0,025	0,027	0,032	0,037
ΔŒ précipité (P - P′) . .	0,237	0,433	0,640	0,845	1,045

Δ : représente l'intervention de l'œnotanin dans la coloration. Il est obtenu par soustraction des DO totales (T) ou des DO de la fraction surnageante (S) ou encore des DO de la fraction précipitée (P).

en cause. De même, après séparation des deux fractions, on peut voir que la participation de l'œnotanin (Œ) dans la coloration du surnageant (S-S′) est minime et recoupe les résultats présentés sur la figure 2 ; finalement en ce qui concerne la coloration de l'œnotanin (Œ) dans le précipité (P-P′), nous retrouvons les résultats de la figure 3 avec également un certain écart pour l'étalon à 0,5 ml.

Dosage dans les boissons

La conversion des DO mesurées au spectrophotomètre en valeurs pondérales soulève le problème du composé phénolique utilisé comme étalon. Pour ces résultats,

TABLEAU 3

Dosage dans les boissons des polyphénols totaux ou fractionnés

Résultats exprimés en g/l

Boissons	Origine	Qualité	Couleur	Dosage total polyphénols	Dosage après séparation des deux fractions	
					Polyphénols non astringents	Polyphénols astringents
Vins	Côtes de Fronton	VDQS	rouge	1,460	0,930	0,460
	Côtes du Rhône	AC	rouge	1,870	1,120	0,625
	Bourgogne	AC	rouge	1,830	1,120	0,690
	Bordeaux	AC	rouge	2,220	1,330	0,970
	Rioja	AC	rouge	2,025	1,170	0,860
	Toulouse	—	rouge	1,754	1,500	0,220
	Piémont	AC	rouge	2,300	1,600	0,820
	Corbières	VDQS	rosé	0,500	0,400	0,100
	Jerez	AC	blanc	0,480	0,344	0,092
	Jurançon	AC	blanc	0,350	0,322	0,022
Eaux-de-vie	Gironde	Cognac	—	0,450	0,270	0,170
	Écosse	Whisky	—	0,145	0,098	0,040
	—	Rhum	—	0,142	0,098	0,037
	Gers	Eau-de-vie de marc	—	0,134	0,088	0,040
Bières	Alsace	—	brune	1,456	1,375	0,084
	Alsace	—	blonde	0,414	0,380	0,020
Jus de fruits	—	Raisin	—	0,454	0,275	0,340
	—	Pomme	—	1,928	1,112	0,408

VDQS : Vin délimité de qualité supérieure
AC : Appellation contrôlée

nous avons choisi arbitrairement la D-catéchine qui, outre sa pureté, avait l'avantage de posséder une structure chimique voisine de celle des substances phénoliques présentes dans les boissons.

Les résultats obtenus lors du dosage de diverses boissons sont réunis dans le tableau 3 qui donne séparément les teneurs en composés phénoliques totaux et en fractions tannante et non tannante ; on peut remarquer que dans la presque totalité des dosages la somme des deux fractions équivaut à la fraction totale, exception faite des jus de fruits qui présentent des écarts considérables.

On remarquera que les plus fortes concentrations en tanins se trouvent dans les vins rouges, celles des vins rosés et des vins blancs sont très faibles ; il en est de même pour les bières et les jus de raisin. Le jus de pomme contient une quantité non négligeable de tanins ; la plus forte concentration, parmi les eaux-de-vie, est présente dans le Cognac mais ce tanin est certainement hydrolysable et provient des fûts.

IV. — DISCUSSION

La méthode préconisée permet la séparation et le dosage direct des deux fractions polyphénoliques astringente et non astringente. En effet, les phénols simples tels l'acide gallique ou la D-catéchine ne forment pas de complexes avec la PVP ; par contre, les polymères, qu'il s'agisse de tanins hydrolysables (acide tannique) ou condensés (œnotanins), se complexent intégralement avec la PVP.

Le dimère du leucocyanidol présente à cet égard un comportement particulier : lors du dosage, il se sépare en deux fractions équivalentes. La structure stérique de ce composé pourrait en être la cause ; d'après Masquelier (communication personnelle), ce dimère est constitué d'un mélange de deux isomères optiques. Il est probable que cette isomérie a des répercussions sur l'activité tannante, car de petites variations dans la structure d'une molécule peuvent changer son comportement ; ainsi le 3,5-dihydroxy-9-phénylxanthène précipite les protéines tandis que son homologue le 2,7-dihydroxy est inactif (Tu et Lollar, 1950).

L'étude du mécanisme de la formation de complexes entre les tanins et la PVP a fait l'objet de plusieurs travaux (Gustavson, 1954 ; Gustavson, 1963). Récemment Mennet et Nakayama (1970) ont étudié la cinétique d'adsorption des composés phénoliques du vin sur une PVP insoluble ; ces auteurs montrent que l'adsorption est fonction de la température, mais qu'elle n'est cependant jamais totale ; par ailleurs, les anthocyanes sont partiellement adsorbés par cette PVP. Dans nos conditions expérimentales, le mécanisme de la réaction est tout autre ; en effet, la PVP utilisée est soluble et nous pensons qu'il y a d'abord formation d'un complexe soluble tanin-PVP qui précipite intégralement lors de l'addition du TCA, car si on ajoute le TCA avant la PVP, la quantité de tanins complexée est plus faible et très variable.

Comme nous l'avons déjà indiqué, la nature des composés phénoliques dosés varie selon la méthode utilisée, aussi il est difficile de comparer avec d'autres méthodes les valeurs que nous avons obtenues pour les boissons. La reproductibilité du dosage est excellente et on peut vérifier dans le surnageant l'absence de composés astringents en réalisant un nouveau dosage après neutralisation du TCA. Par ailleurs,

nous avons contrôlé la possibilité d'une adsorption des anthocyanes par les tanins en ajoutant à un vin déterminé (servant de témoin) une quantité connue d'œnotanin. La comparaison avec le témoin nous a montré que, dans ces conditions de dosage, il n'y a pas d'adsorption.

En ce qui concerne les teneurs données pour les composés phénoliques non astringents, elles n'ont qu'une valeur relative du point de vue chimique à cause de la diversité des substances phénoliques présentes (acides benzoïques, acides cinnamiques, flavonols et anthocyanidines). Le dosage colorimétrique par le réactif de Folin et Ciocalteu est peu spécifique ; ceci est sans importance pour la fraction tannante puisque celle-ci a déjà été séparée par ses propriétés physico-chimiques caractéristiques. Quant aux autres composés phénoliques, il est probable qu'ils peuvent être dosés plus spécifiquement. A ce sujet, nous signalerons l'existence d'une différence importante entre le dosage de la fraction totale des phénols des jus de fruits et le dosage après séparation. Il n'est pas exclu que, dans ces boissons, la présence d'un conservateur, l'acide ascorbique, qui donne aussi la réaction de Folin, explique cette différence, car en milieu alcalin cet acide s'oxyde très facilement (cette condition est réalisée malgré l'agitation lors de l'addition de NaOH 1,5 N au surnageant). De même, la teneur élevée de polyphénols dans la bière brune peut être due à la présence de produits de caramélisation et de la réaction de Maillard.

Reçu pour publication en janvier 1972.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. le Professeur MASQUELIER d'avoir bien voulu nous fournir les échantillons de leucocyanidol et un produit riche en œnotanins.

SUMMARY

TANIN CONTENT OF BEVERAGES. SEPARATION AND COLORIMETRIC TITRATION OF ASTRINGENT POLYPHENOLIC FRACTION

We determined the tanin content of different beverages (wines, spirits, beers and fruit juices) by an original method based on a specific characteristic of tanins : astringency. After preliminary dilution of the beverages, the tanins present in the sample form a soluble complex with polyvinylpyrrolidone ; this complex is entirely precipitated by the addition of trichloracetic acid ; the precipitate containing the tanins is then separated by centrifugation from the outer layer which contains the non-astringent phenolic compounds. After dissolving the precipitate colorimetric titration is carried out with the help of Folin's and Ciocalteu's reagent. From the outer layer total titration of the non-astingent phenolic compounds can be realized. The method described permits between 10 and 50 μg hydrolyzable or condensed tanins to be titrated with about 2 p. 100 accuracy.

RESUMEN

CONTENIDO EN TANINOS DE LAS BEBIDAS. SEPARACION Y DOSIFICACION COLORIMETRICA DE LA FRACCION POLIFENOLICA ASTRINGENTE

Hemos determinado el contenido en taninos de diversas bebidas (vinos, aguardientes, cervezas y zumos de frutas) por medio de un método original fundato en un carácter específico de los taninos : la astringencia. Previa dilución de las bebidas, los taninos presentes en la muestra forman un complejo soluble con la polivinilpirrolidona. Esta complejo queda precipitado íntegramente por adición de ácido tricloracético y, acto seguido, se separa por centrifugación el precipitado que contienen los taninos del sobrenadante que contiene los compuestos fenólicos no astringentes. Después de la disolución del precipitado, se lleva a cabo una dosificación colorimétrica por medio del reactivo de Folin y Ciocalteu. A partir del sobrenadante es posible realizar una dosificación global de los compuestos fenólicos no astringentes. El método descripto permite dosificar entre 10 y 50 μg de taninos hidrolizables o condensados, con una precisión del orden de un 2 por ciento.

RIASSUNTO

TENORE DI TANNINI NELLE BEVANDE. SEPARAZIONE E DOSAGGIO COLORIMETRICO DELLA FRAZIONE POLIFENOLICA ASTRINGENTE

Abbiamo determinato il tenore di tannini in varie bevande (vini, acquaviti, birre e succhi di frutta) mediante un metodo originale basato su un carattere specifico dei tannini : l'astringenza. Dopo diluzione delle bevande, i tannini presenti nel campione formano un complesso solubile con la polivinilpirrolidone. Questo complesso è integralmente precipitato con l'aggiunta di acido tricloroacetico ; si separa poi mediante centrifugazione il precipitato che contiene i tannini dal gallegiante che racchiude i composti fenolici non astringenti. Dopo dissoluzione del precipitato, un dosaggio viene effettuato mediante il reattivo di Folin e Ciocalteu. A partire dal gallegiante, si puo' realizzare un dosaggio globale dei composti fenolici non astringenti. Il metodo descritto permette di dosare tra 10 e 50 μg di tannini idrolizzabili o condensati con una precisione dell'ordine di 2 p. 100.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GSTIRNER F., BOPP A., HOPMANN H., 1956. Über eine colorimetrische agglutination Methode zur Bestimmung von Gerbstoffen. *Arch. Pharm.*, **289**, 188-196.

GSTIRNER F., KORF G., 1966. Bestimmung der Gerbstoffe mit Milchelweiss. *Arch. Pharm.*, **299**, 763-768.

GUSTAVSON K. H., 1954. Interaction of vegetable tanins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagene for its bindung of tanins. *J. Polymer. Sci.*, **12**, 317-324.

GUSTAVSON K. H., 1963. Die Bindung vegetabilischer Gerbstoffe an die CONH-gruppe Polyvinylpyrrolidone. *Leder.*, **14**, 27-34.

MASQUELIER J., VITTE G., ORTEGA M., 1959. Dosage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **98**, 145-148.

MASQUELIER J., MICHAUD J., 1965. État des leucoanthocyanes dans le rhytidome de *Pinus maritima* LAMK. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **104**, 33-36.

MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN W., 1959. Studies on regeneration of proteins from insoluble protein : tanin compounds. I. Removal of tanin from the protein : tanin compounds by caffeine. *Acta Biochim. polon.*, **6**, 385-397.

MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN W., KUDREWICZ-HUBICKA Z., 1966. Application of urea, $FeNH_4(SO_4)_2$ and casein for determination of tanning substances in plants. *Acta Biochim. polon.*, **13**, 57-67.

MENNETT R. H., NAKAYAMA T. O. M., 1970. Temperature dependence of tanin adsorption by poly-N-vinylpyrrolidone. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **21**, 162-167.

MITJAVILA S., DERACHE R., 1968. Dosage du tanin et de l'acide gallique dans un même échantillon. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **28**, 87-94.

NEUBAUER C., 1872. Studien über deden Rothwein. *Ann. Œnologie*, **2**, 1.

NICK E., 1953. Über eine mikro-Bestimmungs Methode für Gerbstoffe mit Hilfe von Hautpulver. *Pharm. industr.*, **15**, 382-384.

PIGMAN W., ANDERSON E., FISCHER R., BUCHANAN M. A., BROWNING B. L., 1953. Color precursors in spruce and western hemlock woods and inner barks. *Tappi*, **35**, 1-21.

PRO M. J., 1952. Report on spectrophotometric determination of tanin in wine spirits. *J. Ass. offic. agric. Chem.*, **35**, 255-257.

PUISAIS J., GUILLER A., LACOSTE J., HUTEAU P., 1968. Dosage spectrophotométrique des tanins. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 277-285.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins*. Librairie polytechnique Béranger, Paris.

RIBÉREAU-GAYON P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris.

ROSENBLATT M., PELUSO J. V., 1941. Determination of tanins by photocolorimeter. *J. Ass. offic. agric. Chem.*, **24**, 170-181.

SINGLETON V. L., ROSSI J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158.

SNELL F. D., SNELL C. T., 1953. *Colorimetric methods of analysis*. 3e édition, vol. 3, 104-162. Van Nostrand Co, New York.

TU S. T., LOLLAR R. M., 1950. A concept of the mechanism of tannage by phenolic substances. *J. amer. Leather Chem. Ass.*, **45**, 324-349.

VALAER P., 1941. Report on whisky and rum tanins in potable spirits. *J. Ass. offic. agric. Chem.*, **24**, 224-321.

WASICKY R., 1917. Über Ersatz von *Radix ratanniae* durch einheimische Gerbsttofferogen und die biologische Bewertung der adstringierenden Wirkung. *Pharm. Post.*, **50**, 785-787.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 347-355.

RECHERCHES SUR L'ARÔME DU MUSCAT

III. — ÉTUDE DE LA FRACTION TERPÉNIQUE

C. BAYONOVE et R. CORDONNIER
avec la collaboration technique de R. RATIER

Station de Technologie végétale,
Centre de Recherches, I. N. R. A.,
34 - Montpellier

RÉSUMÉ

L'extraction au pentane de distillats sous vide de raisins broyés et la chromatographie en phase gazeuse des extraits pentaniques ont permis de mettre en évidence le linalol, le terpinéol, le citral, le citronellol, le nérol, le géraniol ; ceux-ci sont particulièrement abondants dans les muscats mais présents aussi dans les cépages non muscats.

L'addition de tous ces composés très odorants à un jus neutre, dans les proportions où on les trouve dans les muscats, montre qu'ils participent de façon importante à l'arôme des muscats.

Mots clés : *arôme, raisin, muscat, terpènes.*

INTRODUCTION

La chromatographie en phase gazeuse des constituants volatils du raisin extraits par entraînement à l'azote ou émis par les baies écrasées permet de définir un certain profil aromatique des muscats. Le linalol peut ainsi être mis nettement en évidence et son évolution suivie au cours de la maturation du fruit (BAYONOVE, CORDONNIER, 1970 *a*).

Mais ces techniques laissent dans l'ombre une « fraction lourde ». Son existence, révélée seulement dans les muscats, nous avait cependant fait admettre qu'elle pouvait participer plus spécialement, au même titre que le linalol, à l'arôme des muscats (BAYONOVE, CORDONNIER, 1970 *b*). Nous avons donc cherché à mettre cette fraction en évidence et à mieux en apprécier les principaux constituants par des techniques d'extraction et de séparation chromatographique plus adaptées à son étude.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *La matière première*

Les variétés étudiées ont été les suivantes : les *Muscats d'Alexandrie, d'Alsace, Ottonel, Saint-Vallier* (hybride muscat × *Seyve-Villard*), les métis *HA 22* (*Muscat d'Alsace* × *Chasselas* blanc), *Φ D 9* (*Muscat Ottonel* × *Muscat d'Alsace*), *Φ D 15* (*Muscat Ottonel* × *Muscat d'Alsace*), qui sont des obtentions de la Station de Recherches viticoles de Colmar, et trois cépages non muscats : *Auxerrois, Riesling* et *Chasselas* blanc.

2. — *Extraction des constituants volatils*

Un kilogramme de baies broyées est distillé sous vide à 40°C dans un évaporateur rotatif de type Keller, muni d'un réfrigérant ascendant maintenu à 0°C qui permet de faire rétrograder dans le ballon condenseur les vapeurs émises lors de la distillation. L'opération est poursuivie jusqu'à l'obtention d'un volume de distillat de 750 à 800 ml.

L'extraction proprement dite est réalisée dans une colonne de verre (300 × 0,8 cm) à la partie inférieure de laquelle est adapté un fin tube de vervyl. La colonne est remplie d'eau sur une hauteur de 20 cm puis de pentane (130 ml) sur une hauteur de 275 cm. Le liquide à extraire est introduit par gravité au sommet de la colonne à travers un capillaire et tombe en pluie très fine. Après avoir traversé toute la colonne de solvant, il ressort par le tube de vervyl maintenu à une hauteur telle qu'il reste toujours une vingtaine de centimètres de liquide de garde à la base de la colonne. Le débit de celle-ci est réglé à 150 ml/heure. A la fin de l'extraction, l'extrait pentanique est récupéré, séché sur sulfate de sodium anhydre puis concentré par distillation à 35°C jusqu'à un volume d'environ 0,2 ml. Cette technique permet d'extraire les alcools terpéniques avec un rendement de 40 à 60 p. 100.

3. — *Méthodes d'analyse des extraits*

Chromatographie en phase gazeuse.

L'appareil utilisé est un Aérograph 1400 à ionisation de flamme et à programmation linéaire de température, équipé d'un enregistreur Varian 20.

Les analyses sont faites par injection de 2 μl d'extrait sur une colonne (10 pieds, 1/8 de pouce) de carbowax 20 M à 10 p. 100 sur chromosorb W 80/100, lavé aux acides.

Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 180°C et 250°C. Celle du four est au départ de 135°C puis est progressivement augmentée jusqu'à 180°C suivant un gradient de 2°C par minute. Le débit du gaz vecteur, l'azote, est réglé à 25 ml/mn et l'alimentation de la flamme assurée par un débit d'hydrogène de 25 ml/mn et d'air (300 ml/mn). La vitesse du papier enregistreur est réglée à 40 pouces à l'heure.

Pour comparer quantitativement les constituants volatils des divers échantillons, on introduit avant l'injection, dans les 0,2 ml d'extrait, 8 μl d'une solution de phtalate d'éthyle à 0,1 p. 100 dans l'éthanol. Les résultats sont alors exprimés par le rapport des surfaces des pics étudiés à celle du pic de l'étalon interne.

Identification des constituants volatils.

Celle-ci est réalisée, en première approximation, par la méthode de Kovats modifiée par Mestre et Soulié (1965), l'octodécane étant pris comme corps de référence pour le calcul des indices.

L'identité des constituants volatils ainsi repérés par leur temps de rétention relatif a été confirmée par spectrométrie de masse après concentration et séparation partielle par chromatographie sur gel de silice à partir des extraits pentaniques primitifs.

Concentration et purification de la fraction terpénique sur colonne de gel de silice.

L'extrait pentanique (0,2 ml) amené à 0,5 ml avec du pentane est introduit sur une colonne (20 × 0,9 cm) contenant en mélange 2 g de gel de silice (Kieselgel H. Merck) et 1 g de célite 545. (Avant utilisation, la célite et le gel de silice doivent être lavés par un mélange pentane-acétate d'éthyle (70 v/30 v) puis séchés à l'étuve 12 heures à 100°C). Ce mélange est au préalable activé une demi-heure à 120°C et introduit dans la colonne sous forme de suspension dans du pentane.

L'élution est réalisée par 25 ml de pentane pur qui déplace les terpènes puis par 100 ml d'un mélange pentane-acétate d'éthyle (94 v/6 v). Des fractions de 2,5 ml sont recueillies à la sortie de la colonne.

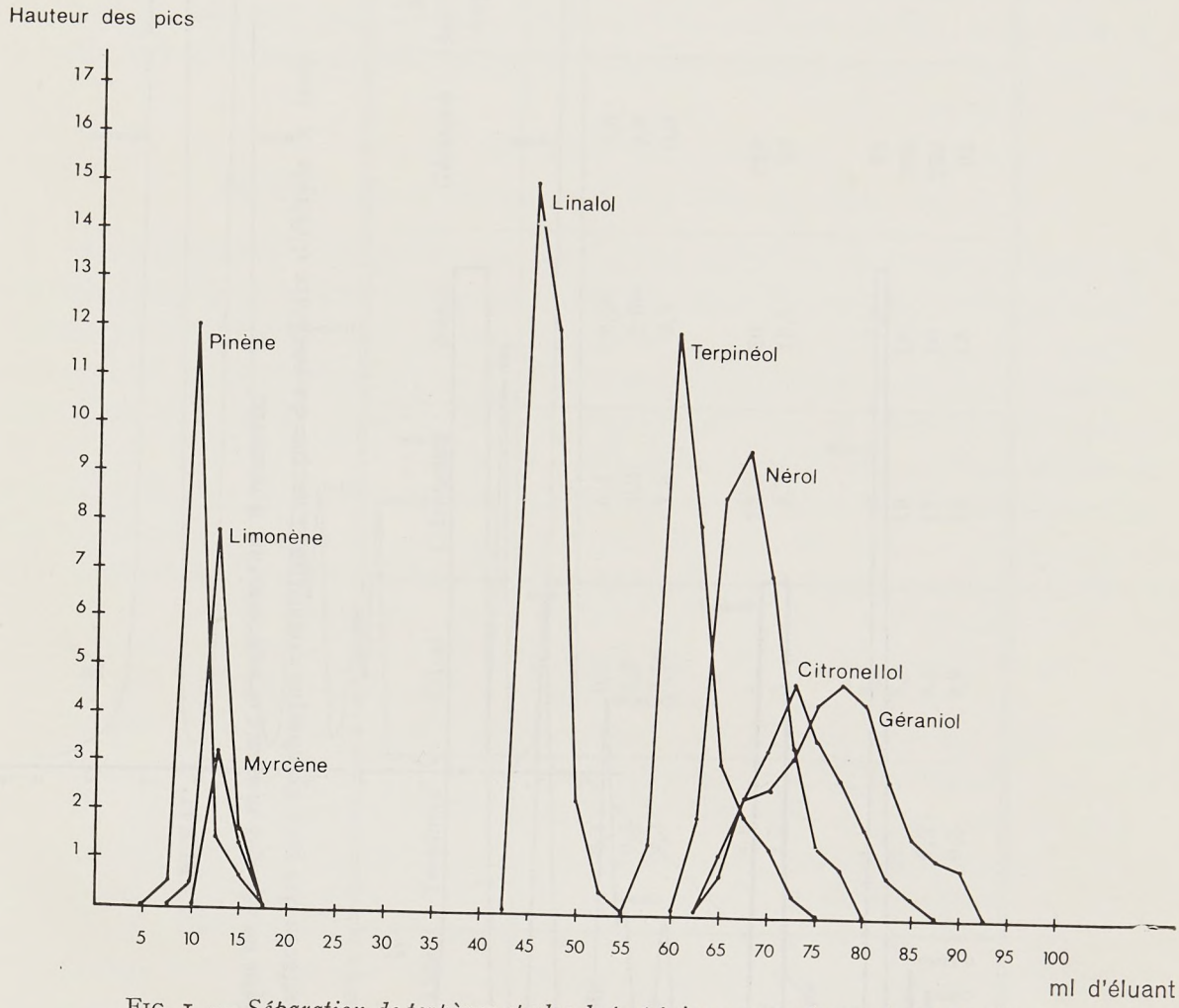


FIG. 1. — *Séparation de terpènes et alcools terpéniques sur colonne de gel de silice*

La figure 1 donne le diagramme d'élution d'une solution modèle de terpènes et alcools terpéniques ; on voit qu'il est possible d'isoler, dans de petits volumes, une fraction terpénique et le linalol et de réaliser des fractions enrichies en terpinéol, nérol, citronellol et géraniol.

Cette technique nous a permis d'obtenir, à partir des extraits pentaniques de raisin, des fractions suffisamment concentrées et simplifiées pour que leurs constituants volatils puissent être séparés et identifiés à l'aide d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (Varian MAT CH 5), à la Station de Technologie des Produits végétaux du Centre de Recherches agronomiques de Dijon.

L'analyse olfactive des fractions éluées à la sortie de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse nous a permis de faire un choix parmi elles : seules ont été étudiées celles qui étaient odorantes.

RÉSULTATS

Profil aromatique du Muscat d'Alexandrie; *son évolution au cours de la maturation*

La figure 2 donne un exemple des profils aromatiques obtenus à différents stades de maturité du *Muscat d'Alexandrie*.

De ces profils, nous ne retiendrons pas les parties en deçà du linalol et au-delà

du géraniol ; les conditions expérimentales choisies ne permettent pas de bien les révéler.

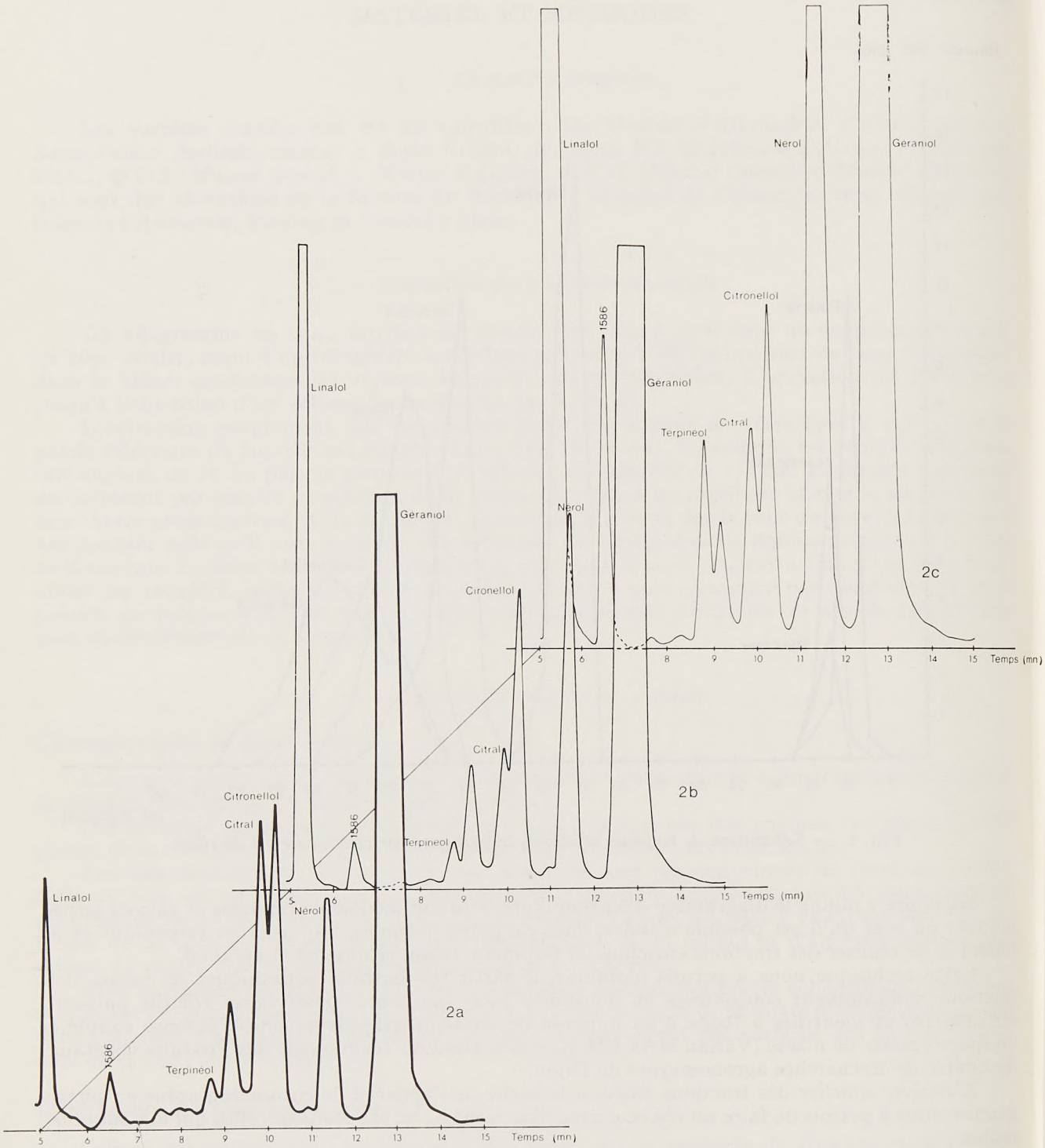


FIG. 2. — *Profil aromatique du* Muscat d'Alexandrie *à différents stades de maturité : raisin vert* (fig. 2 *a*), *véré* (fig. 2 *b*), *mûr* (fig. 2 *c*)

La partie centrale est au contraire particulièrement bien mise en évidence par les techniques d'extraction et de séparation chromatographique adoptées ici. Elle comprend au moins onze fractions parmi lesquelles sept très odorantes correspondent au linalol, terpinéol, citral, citronellol, nérol et géraniol ; la septième, d'indice 1586, n'a pu être identifiée.

Ces composés sont déjà présents dans le raisin vert (fig. 2 *a*) qui contient en

TABLEAU I

Composition terpénique de cépages muscats et non muscats à maturité

(Les nombres correspondent au rapport des surfaces des pics de chaque constituant au pic du phtalate d'éthyle × 100)

	Hexanol	Linalol	Indice 1586	Terpinéol	Citral	Citronellol	Nérol	Géraniol	Somme des composés terpéniques
Cépages non muscats									
Auxerrois	16	0,2	0,50	0,1	0,1	0,1	0,40	2,0	3,0
Riesling	0,16	4,5	0,6	0,3	1,7	1,3	1,00	3,0	11,8
Chasselas blanc	27	5,7	1,3	0,3	0,50	1,3	2,2	8,0	18
Muscats									
d'Alsace	12	122	3	2,4	4	19,2	80	180	407
Ottonel	12	131	1,7	2,7	5	5,7	18,5	97	260
Métis de muscats									
HA 22	51	153	2,7	1	3,6	9	7,0	82	255
Φ D 9	44	790	77	21	5,8	19	18	216	1 070
Saint-Vallier	47	296	6,5	4,2	8,0	11	10	250	579
Φ D 15	56	13	2,8	0,5	3,8	10	15	95	137

particulier presque autant de géraniol, de citral et de citronellol que le raisin mûr (fig. 2 *c*).

Du stade vert au stade mûr on peut calculer, en mesurant la surface des pics, que le raisin mûr contient environ six fois plus de linalol, cinq fois plus de terpinéol et du corps d'indice 1586, quatre fois plus de nérol et seulement 1,4 fois plus de géraniol que le raisin vert.

Profils aromatiques de quelques muscats et non muscats

Si on se reporte aux résultats rassemblés dans le tableau 1, on constate que tous les cépages étudiés, muscats ou non, contiennent les composés terpéniques mis en évidence dans le *Muscat d'Alexandrie*. Cependant, les muscats sont dix à cent fois plus riches en composés terpéniques que les non muscats. Au contraire, la quantité d'hexanol, pris comme exemple de composé non terpénique, n'est pas significativement différente entre ces deux catégories de cépages.

La proportion de chacun des composés terpéniques identifiés par rapport à la fraction terpénique totale est sensiblement la même chez les cépages muscats et non muscats (tabl. 2). Le géraniol et le linalol représentent de 70 à 90 p. 100 de cette

TABLEAU 2

Profil terpénique des cépages étudiés

(exprimé par le pourcentage des différents composés identifiés dans la fraction terpénique totale)

	Linalol	Géraniol	Nérol	Citronellol	Citral	Terpinéol
Cépages non muscats						
Auxerrois	8	69	13	5	2,5	5
Riesling	38	24	8,5	11,3	15,0	2,4
Chasselas blanc	32	43	12	7,4	2,8	1,8
Moyenne	26	45	11	7,9	6,7	3
Muscats						
d'Alsace	30	44	19	5	1	0,5
Ottonel	50	37	7	2	2	1
d'Alexandrie (1)	23	40	19	7	5,5	4
Moyenne	35	40	15	5	3	2
Métis de muscats						
HA 22	60	32	2,7	3,5	1,4	0,3
Φ D *9*	78	17	1,7	1,8	0,5	1,9
Saint-Vallier	51	43	1,7	1,9	1,3	0,7
Φ D *15*	9	69	11	7	2,7	0,3
Moyenne	50	40	4,0	3,5	1,5	1

(1) Résultats calculés à partir de la surface des pics de la figure 2 *c*.

fraction ; viennent ensuite, par ordre décroissant d'importance, le nérol puis le citronellol, le citral et le terpinéol. On observe en outre des variations importantes autour des pourcentages moyens pour chacun des composés pour certaines variétés.

DISCUSSION - CONCLUSION

Les techniques d'extraction et de chromatographie en phase gazeuse utilisées dans ce travail nous ont permis d'apporter des précisions intéressantes sur quelques composés terpéniques présents dans le raisin.

Le linalol, le terpinéol, le citral, le citronellol, le nérol et le géraniol sont présents dans tous les cépages étudiés, qu'il soient muscats ou non muscats (tabl. 1). Mais ils sont de dix à cent fois plus abondants dans les muscats, notamment le linalol et le géraniol qui représentent environ les trois quarts de la fraction terpénique étudiée (tabl. 2).

L'importance quantitative de ces deux alcools terpéniques avait déjà été notée par l'un de nous (CORDONNIER, 1956) et STEVENS *et al.* (1966), mais une étude comparative avec des cépages non muscats n'avait pas été réalisée jusqu'ici, pas plus que celle de leur évolution au cours de la maturation.

Malgré le petit nombre de cépages étudiés, il est clair que ces constituants ne sont pas spécifiques de la variété muscat. Au contraire, on les trouve sensiblement dans les mêmes proportions relatives dans les muscats et les non muscats (tabl. 2).

Les seules différences observées sont d'ordre quantitatif. On peut donc seulement dire que les muscats sont caractérisés par une plus grande richesse en composés terpéniques. Ces résultats confirment nos premières conclusions en ce qui concerne le caractère non spécifique de la présence du linalol chez les muscats (BAYONOVE, CORDONNIER, 1971).

Le fait que la « formule » terpénique des cépages muscats et non muscats soit sensiblement la même (tabl. 2) laisse supposer que les voies métaboliques de leur biosynthèse sont les mêmes. La plus grande richesse des muscats en ces composés peut s'interpréter par une plus grande activité des systèmes enzymatiques impliqués et (ou) par une teneur plus élevée en précurseurs, l'acide mévalonique par exemple et le géranylphosphate. Ce dernier, on le sait, est la plaque tournante de la synthèse des composés terpéniques, en particulier du nérol et du géraniol et de leurs dérivés respectifs : limonène, pinène, terpinéol d'une part, et linalol, citronellol, citral d'autre part.

Parmi les composés identifiés, le géraniol paraît occuper une place à part. Il est le plus abondant dans le raisin vert (fig. 2 *a*) et il augmente peu au cours de la maturation, en tout cas beaucoup moins que la plupart des autres composés terpéniques, le linalol et le nérol en particulier (fig. 2 *c*). Tout se passe donc comme si, au cours de la maturation, l'accumulation de ces composés se faisait aux dépens du géraniol. La voie géranylphosphate ⟶ géraniol ⟶ linalol serait dans ce cas la voie prépondérante parmi celles possibles de la biosynthèse des dérivés terpéniques du raisin.

S'il en est bien ainsi, cette filiation géraniol ⟶ linalol pourrait déboucher

sur des applications pratiques importantes. On peut en effet émettre l'hypothèse que le rapport géraniol/linalol d'un muscat varie dans des limites à préciser, mais sans doute plus étroites que les variations observées dans un vin additionné d'aromatisants riches en linalol (sureau, coriandre, par exemple) ou dans lesquels ce rapport géraniol/linalol peut être différent. Cette hypothèse, si elle était vérifiée, pourrait fournir un moyen de dépistage de certaines falsifications.

Quoi qu'il en soit, ce travail met bien en évidence l'importance quantitative du géraniol, du linalol et à un degré moindre du nérol parmi les autres constituants terpéniques participant à l'arôme du muscat.

Du point de vue qualitatif, on constate que les cépages à goût muscat prononcé ont aussi les plus fortes teneurs en géraniol, linalol, nérol, citronellol, citral, terpinéol. Cependant si on ajoute ces composés à un jus d'*Ugni* blanc neutre de goût, dans les proportions moyennes où nous les avons trouvés dans le muscat, ils lui confèrent un arôme agréable qui s'apparente à celui du muscat mais d'une façon encore imparfaite.

D'autres constituants contribuent donc à donner, avec ceux déjà identifiés, leur « vrai caractère » aux muscats. Certains se situent peut-être dans les fractions qui apparaissent discrètement et mal séparées sur les chromatogrammes après le géraniol, ou passent encore inaperçues en raison de leur trop faible concentration dans nos extraits. C'est ainsi, par exemple, que le limonène n'a pas été mis en évidence, bien qu'il soit présent dans les muscats (CORDONNIER, 1956 ; STEVENS *et al.*, 1956).

Reçu pour publication en janvier 1972.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. WAGNER, de la Station de Recherches viticoles de Colmar, d'avoir eu l'obligeance de nous fournir les raisins des cépages alsaciens, et MM. DUBOIS et BRULÉ, de la Station de Technologie des Produits végétaux de Dijon, qui ont fait les travaux d'identification par spectrométrie de masse.

SUMMARY

RESEARCHES ON THE AROMA OF MUSCAT
III. — STUDY OF THE TERPENIC FRACTION

Pentane extraction of distillates, under vaccum, from crushed grapes and chromatography in gaseous phase of the pentanic extracts permitted linalol, terpineol, citral, citronellol, nerol and geraniol to be shown ; these are particularly abundant in muscats, but are also present in non-muscat vine-plants.

The addition of all these very fragrant compounds to a neutral juice in the proportions in which they are found in muscats shows that they play an important role in the aroma of muscats.

RESUMEN

INVESTIGACIONES ACERCA DEL AROMA DEL MOSCATEL
III. — ESTUDIO DE LA FRACCION TERPENICA

La extracción por medio del pentano de destilados en vacío de uvas prensadas y la cromatografía en fase gaseosa de los extractos pentánicos han permitido hacer resaltar el linalol, el terpineol, el citral, el citronelol, el nerol y el geraniol. Todos ellos son particularmente abundantes en los moscateles, aun cuando también se encuentran presentes en variedades de cepa distintas del moscatel.

La adición de todos estos compuestos sumamente odorantes a un zumo de uva neutro, en las proporciones en que los mismos se encuentran en los moscateles, demuestra que su participación en el aroma de los moscateles es importante.

RIASSUNTO

RICERCHE SULL'AROMA DEL MOSCATO
III. — STUDIO DELLA FRAZIONE TERPENICA

L'estrazione al pentano di distillati sotto vuoto di uva macinata e la cromatografia in fase gassosa degli estratti pentanici, hanno permesso di mettere in evidenza il linalolo, il terpineolo, il citrale, il citronellole, il nerolo, il geraniolo ; questi sono particolarmente abbondanti nei moscati ma anche presenti nei vitigni non moscati.

L'aggiunta di tutti questi composti molto odorosi con succo neutro, nella proporzione in cui si trovano nei moscati, mostra che essi intervengono per una gran parte nell'aroma dei moscati.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAYONOVE C., CORDONNIER R., 1970 *a*. Recherches sur l'arôme du muscat. I. Évolution des constituants volatils au cours de la maturation du *Muscat d'Alexandrie*. *Ann. Technol. agric.*, **19** (2), 79-93.

BAYONOVE C., CORDONNIER R., 1970 *b*. Recherches sur l'arôme du muscat. II. Profils aromatiques de cépages muscat et non muscat. Importance du linalol chez les muscats. *Ann. Technol. agric.*, **19** (2), 95-105.

BAYONOVE C., CORDONNIER R., 1971. Le linalol, constituant important mais non spécifique de l'arôme des muscats. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, (à paraître).

CORDONNIER R., 1956. Recherches sur l'aromatisation et le parfum des vins doux naturels et des vins de liqueur. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 75-110.

MESTRE R., SOULIÉ Mme J., 1965. Identification par chromatographie gazeuse de l'arôme de framboise. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **25** (4), 239-255.

STEVENS K. L., BOMBEN J., LEE A., MCFADDEN W. H., 1966. Volatiles from grapes. *Muscat of Alexandria*. *J. agric. Food Chem.*, **14** (3), 249-252.

WEBB A. D., KEPNER R. E., LINDA MAGGIORA, 1966. Gas chromatographic comparison of volatile aroma materials extracted from eight different muscat-flavored varieties of *Vitis vinifera*. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **17** (4), 247-254.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 357.

CHRONIQUE DES LIVRES

PERTES DE MASSE DES DENRÉES ALIMENTAIRES. COMPTE RENDU DES TRAVAUX DES COMMISSIONS II, IV, V, VII. — Leningrad, septembre 1970. — Paris, Institut international du Froid, 1971, 382 p.

Cet ouvrage appartient à la collection « Science et Technique du Froid », titre sous lequel l'Institut International du Froid publie les rapports présentés au cours des réunions de ses commissions sinternationales, scientifiques et techniques. Il rend compte des travaux des Commissions II (transfert de chaleur et de masse), IV (le froid appliqué aux produits périssables), V (entreposage frigorifique) et VII (transports frigorifiques terrestres) qui se sont réunies à Léningrad du 8 au 13 septembre 1970.

Quarante-cinq rapports ont été présentés émanant de seize pays.

Le thème général de la réunion était « les pertes de masse des denrées alimentaires au cours de la réfrigération, de la congélation, du stockage et du transport » et les rapports ont traité d'une part des problèmes physiques du transfert de chaleur et de masse conduisant aux pertes de masse dans les aliments et d'autre part des pertes de masse concernant la viande, le poisson, les fruits, la volaille, les œufs et divers produits.

Anal. éd.

POMERANZ (Y.) éd. — WHEAT CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. — 2e édition, Saint Paul (Minnesota, U. S. A.), American Association of Cereal Chemists, Inc., 1971, 821 p., (Monograph Series, vol. III).

Ce livre, œuvre de collaborateurs américains, anglais, suisses et néerlandais, est consacré au problème important de l'amélioration de la qualité du blé et de ses produits industriels. C'est une revue approfondie des connaissances et des possibilités actuelles dans ce domaine. L'accent est mis sur deux aspects principaux : les progrès des études biochimiques, d'une part, et les méthodes technologiques modernes de fabrication, d'autre part.

La première partie traite des critères de qualité du blé. On y trouve les aspects agronomiques généraux, ainsi que les problèmes économiques de la culture et de l'exploitation. Il y est traité, également, des divers aspects botaniques et physico-chimiques, dépendant des variétés et des traitements de semences, ainsi que de leurs conséquences sur la valeur nutritive du blé.

La deuxième partie est consacrée aux propriétés de la graine de blé, au processus de la mouture et à la qualité de la farine obtenue.

Suit une partie concernant la constitution chimique du blé et de la farine et leurs interrelations. Une étude détaillée est faite de chaque type de constituants : protéines, acides aminés, hydrates de carbone, lipides, enzymes et pigments — ainsi que de leurs modifications au cours de la conservation et du processus de panification.

La partie suivante étudie les propriétés et la fabrication de la pâte, en relation avec les qualités de la farine et avec les aspects technologiques.

La dernière partie du livre traite des produits finaux du blé et des divers facteurs influençant leur qualité. Un chapitre est consacré au pain ; deux chapitres concernent les deux types principaux de blé : dur et tendre, ainsi que leurs produits autres que le pain : biscuits et pâtisseries, pâtes, etc.

L'ouvrage s'achève sur les perspectives d'avenir de ce domaine, dans la situation actuelle et avec les progrès que le développement des méthodes d'étude et des procédés techniques permettra.

M. M.

Ann. Technol. agric., 1971, **20** (4), 359-362.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1971

P. André, S. Aubert, C. Pelisse. — Contribution aux études sur les vins rosés méridionaux. III. — Importance du mode d'élaboration sur la qualité des vins rosés 5

S. Aubert. — L'aubergine (*Solanum melongena* L.). I. — Composition et facteurs de qualité 241

C. Bayonove, R. Cordonnier. — Recherches sur l'arôme du muscat. III. — Étude de la fraction terpénique 347

P. Bénard, M. Buret, C. Flanzy, M. Bourzeix. — Méthode de vinification par macération carbonique. V. — Influence de la hauteur de vendange dans la cuve sur la qualité des vins 35

P. Bénard, M. Bourzeix, M. Buret, C. Flanzy, J. Mourgues. — Méthode de vinification par macération carbonique. VI. — Élaboration des vins blancs secs 199

P. Bréchot, J. Chauvet, P. Dupuy, Madeleine Croson, Arlette Rabatu. — Acide oléanolique, facteur de croissance anaérobie de la levure de vin 103

J. Bricout. — Analyse de quelques constituants dérivés du chêne dans les vieilles eaux-de-vie d'Armagnac 217

G. Brulé, P. Dubois, Tzv. Obretenov. — Étude des produits volatils formés par dégradation du glucose en présence de proline 305

Claudine Charpentier, P. Isoard, J. Bergeret, R. Fontanges. — Étude comparée des antigènes de sept levures de vinification par agglutination et immunofluorescence 323

P. Dubois, G. Brulé, M. Ilic. — Étude des phénols volatils de deux vins rouges 131

J. Duclos, A. Latrasse. — Comparaison des produits fixes et volatils de variétés de framboises à divers stades de maturité 141

C. Flanzy, M. Buret, Y. Chambroy. — Fixation à l'obscurité d'acide malique 3-^{14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose 49

K. Kobrehel. — Détermination de la teneur en œufs des pâtes alimentaires. I. — Par analyse de la fraction lipidique. Dosage des lipides, de la choline et des acides gras 75

K. Kobrehel, P. Feillet. — Détermination de la teneur en œufs des pâtes alimentaires. II. — Séparation électrophorétique et dosage de protéines spécifiques 153

Suzanne LAFON-LAFOURCADE. — Le dosage enzymatique de l'acide glutamique dans les jus de raisin et les vins 111

C. LOINGER, B. SAFRAN. — Interdépendance entre le rendement, la maturation des raisins et la qualité des vins 225

J. MATHELIN, J. CLÉMENT, V. CAUMARTIN. — Modifications quantitatives et qualitatives des phospholipides d'un lait cru de vache au cours du stockage 313

S. MITJAVILA, M. SCHIAVON, R. DERACHE. — Teneurs en tanins des boissons. Séparation et dosage colorimétrique de la fraction polyphénolique astringente 335

A. PAULIN. — Influence de la composition de la solution nutritive sur la teneur en divers acides aminés libres et en ammoniac des pétales de roses coupées 283

C. POMPÉI, C. PÉRI, G. MONTEDORO. — Le dosage des leucoanthocyanes dans les vins blancs 21

M. SOUTY, P. ANDRÉ, Liliane BREUILS, G. JACQUEMIN. — Étude sur la qualité des amandes (*Amygdalus communis* L.). Variabilité de quelques caractères biochimiques 121

Marie-Thérèse TOLLIER, A. GUILBOT. — Étude de l'action des amylases alpha et bêta sur l'amidon irradié par rayonnement gamma 61

C. VALIN, A. PINKAS. — La maturation de la viande. Évolution *post mortem* de la tendreté et transformations biochimiques des protéines myofibrillaires 167

Notes techniques.

J.-C. AUTRAN, A. BOURDET. — La détermination des constituants nucléiques du blé et leur répartition dans le grain 179

Roselyne LUMARET, P. GALZY. — Estimation de la fréquence d'une souche dans une population microbienne 89

J. KOPP. — Test de détermination de l'activité collagénolytique vraie 185

Jeanne POISSON, B. CAHAGNIER. — Sur l'utilisation d'un compteur électronique de particules en mycologie céréalière 265

Chronique des livres 95, 193

CONTENTS

P. ANDRÉ, S. AUBERT, C. PELISSE. — Contribution to researches on meridional rosé wines. III. — Importance of the method of preparation in what concerns the quality of rosé wines 5

S. AUBERT. — The egg-plant (*Solanum melongena* L.). Composition and quality factors 241

C. BAYONOVE, R. CORDONNIER. — Researches on the aroma of muscat. III. — Study of the terpenic fraction 347

P. Bénard, M. Buret, C. Flanzy, M. Bourzeix. — Vine-making by carbonic maceration. V. — Influence of the height of grapes in the vat on the quality of wines 35

P. Bénard, M. Bourzeix, M. Buret, C. Flanzy, J. Mourgues. — Vine. making by carbonic maceration. VI. — Vine-making of dry white wines. 199

P. Bréchot, J. Chauvet, P. Dupuy, Madeleine Croson, Arlette Rabatu. — Oleanolic acid, as a growth factor for wine yeast in anaerobiosis 103

J. Bricout. — Analysis of some compounds arising from the oak wood in old brandies of Armagnac 217

G. Brulé, P. Dubois, Tzv. Obretenov. — Study of the volatile substances formed from the degradation of glucose in the presence of proline 305

Claudine Charpentier, P. Isoard, J. Bergeret, R. Fontanges. — Comparative study of the antigenes of seven wine-making yeasts by means of agglutination and immunofluorescence 323

P. Dubois, G. Brulé, M. Ilic. — Study of volatile phenols of two red wines .. 131

J. Duclos, A. Latrasse. — Comparison of fixed and volatile components in several varieties of raspberries at different stages of ripeness 141

C. Flanzy, M. Buret, Y. Chambroy. — Fixing of 3-^{14}C malic acid in darkness by grapes in anaerobiosis 49

K. Kobrehel. — Determination of the egg content of noodles. I. — By analysis of the lipidic fraction. Dosage of lipids, choline and fatty acids 75

K. Kobrehel, P. Feillet. — Determination of the egg content of noodles. II. — Electrophoretic separation and dosage of specific proteins 153

Suzanne Lafon-Lafourcade. — Enzymatic dosage of glutamic acid in grapes and wines 111

C. Loinger, B. Safran. — Interdependance between the yield, the maturation of grapes and the quality of wines 225

J. Mathelin, J. Clément, V. Caumartin. — Quantitative and qualitative modifications of the fresh cow-milk phospholipids during storage 313

S. Mitjavila, M. Schiavon, R. Derache. — Tanin content of beverages. Separation and colorimetric titration of astringent polyphenolic fraction. 335

A. Paulin. — Influence of the nutritive solution composition on the free amino—acid and ammoniac content in the petals of cut roses 283

C. Pompéi, C. Péri, G. Montedoro. — The dosage of the leucoanthocyanins in white wines 21

M. Souty, P. André, Liliane Breuils, G. Jacquemin. — Study of almond (*Amygdalus communis* L.) quality. Variability of some biochemical characteristics 121

Marie-Thérèse Tollier, A. Guilbot. — Research on the action of alpha and beta amylases on the starch irradiated by gamma radiation 61

C. Valin, A. Pinkas. — Maturation of meat. *Post mortem* development of tenderness and biochemical changes in myofibrillar proteins 167

Technical notes.

J.-C. Autran, A. Bourdet. — The determination of nucleic constituents of wheat and their distribution in the seed 179

Roselyne LUMARET, P. GALZY. — Estimation of the frequency of a strain in a microbial population 89
J. KOPP. — Determination test of the real collagenolytic activity 185
Jeanne POISSON, B. CAHAGNIER. — Use of a particles counter in the field of cereal mycology 265

Book reviews 95, 193

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé :* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Oenologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en Josas. On demande deux exemplaires.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à Mme Collon.

Technologie agricole.

Le Directeur-Gérant : M. L. Cagnac

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 7-1972.

Dépôt légal: 3e trimestre 1972. N° d'impression: 810.